



Ontogénese lipídica associada à  
embriogénese somática e ao crescimento  
de culturas *in vitro* de linho  
(*Linum usitatissimum* L.)

Ana Cristina Gomes da Cunha



Ontogénese lipídica associada à  
embriogénese somática e ao crescimento  
de culturas *in vitro* de linho  
(*Linum usitatissimum* L.)

Ana Cristina Gomes da Cunha

Dissertação apresentada  
à Universidade do Minho,  
para prestação de provas de  
Doutoramento em Ciências

Universidade do Minho  
Departamento de Biologia  
Braga 2001

## DECLARAÇÃO

É autorizada a reprodução integral desta tese, apenas para efeitos de investigação.

(Ana Cristina Gomes da Cunha)

## *Agradecimentos*

O trabalho de investigação desenvolvido e apresentado nesta dissertação foi realizado no **Departamento de Biologia da Universidade do Minho** sob a orientação do Professor Doutor Manuel Fernandes Ferreira e com o apoio da **Fundação para a Ciência e Tecnologia** através da concessão de uma bolsa de doutoramento, no âmbito do programa PRAXIS XXI – **BD/2771/93**. Tendo concluído este trabalho quero expressar a minha gratidão,

À Professora Doutora Cecília Leão, a porta que um dia me abriu...

À Professora Célia Pais, Directora do Departamento, os meios que possibilitaram o fim...

Ao Professor Manuel Ferreira que me ensinou e conduziu...

Aos meus colegas amigos por todas as pausas felizes que fizemos e pela ajuda nas dificuldades (muitas) de percurso...

Aos técnicos que nos bastidores facilitam tanto esta caminhada...

À Manela, à João e à Isabel a partilha de milhares de horas de vida nas viagens entre casa e trabalho e trabalho e casa, onde de tudo se falava, até de trabalho!

Ao Pedro o seu precioso tempo e engenho...

À Isabel um gesto tão generoso...

À Lena sentar-se ao pé de mim todos os dias “há mais de 100 anos”...

À Fátima Machado a sua amizade e o seu Microscópio Electrónico...

Ao João Serôdio a sua Estatística...

Ao Alberto, ao Hernâni, à Lena, à Isabel, à João e à Paula o cuidado e a paciência de ler e rever...

À Teresa e ao Rui as artes finais...

E à minha família... tudo o resto.



*Ao linho...*

# Índice

<i>Resumo</i>	<i>xiii</i>
<i>Abstract</i>	<i>xvii</i>
<i>Abreviaturas e nomenclatura</i>	<i>xxi</i>

## Capítulo I

---

### *Introdução geral*

<i>Ficha histórico-cultural: o linho em Portugal</i>	<i>3</i>
<i>Ficha técnica do linho</i>	<i>7</i>
1. <i>Descrição sumária</i>	<i>7</i>
1.1. <i>Posição sistemática</i>	<i>7</i>
1.2. <i>Morfologia e hábito</i>	<i>7</i>
2. <i>Imagens do linho</i>	<i>8</i>
3. <i>Origem e expansão</i>	<i>9</i>
4. <i>Variedades de linho e exigências da cultura</i>	<i>9</i>
5. <i>Distribuição geográfica</i>	<i>10</i>
6. <i>Usos</i>	<i>10</i>
<i>Enquadramento do tema</i>	<i>12</i>
<i>Contexto das actividades de investigação e desenvolvimento sobre o linho</i>	<i>12</i>
<i>Cultura de tecidos in vitro: uma arte. Alguns conceitos básicos</i>	<i>13</i>
<i>Micropropagação e culturas in vitro de linho</i>	<i>26</i>
<i>Estudo da variação da composição lipídica em culturas in vitro de linho</i>	<i>28</i>
<i>Culturas in vitro: melhoramento e produção de metabolitos</i>	<i>29</i>
<i>Objectivos gerais</i>	<i>31</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>33</i>

## Capítulo II

---

*Cultura In Vitro de Linho (Linum usitatissimum L.): Estabelecimento de Culturas de Calli, Organogénese e Embriogénese Somática. Efeito do tipo e idade do explante e de reguladores de crescimento.*

<i>Resumo</i>	<i>43</i>
---------------	-----------

<i>Introdução</i>	45
<i>Material e Métodos</i>	47
1. <i>Material vegetal e condições de cultura</i>	47
2. <i>Efeito do tipo de explante primário e da suplementação hormonal na resposta das culturas</i>	48
3. <i>Crescimento de calli e capacidade rizogénica: efeitos das auxinas 2,4-D e IBA e das citocininas KIN e ZEA</i>	48
4. <i>Interacção entre auxina, citocinina e giberelina na indução de diferentes vias de diferenciação de tecidos a partir de segmentos de hipocótilo</i>	49
5. <i>Optimização dos níveis de 2,4-D e ZEA no meio MS para indução de embriogénese somática a partir de segmentos de hipocótilo</i>	50
6. <i>Análise estatística</i>	50
7. <i>Observação de diferentes fases da ontogénese dos embriões somáticos por microscopia electrónica de varrimento. Alguns problemas técnicos.</i>	51
<i>Resultados e Discussão</i>	53
1. <i>Efeito do tipo de explante primário e dos reguladores de crescimento na indução de calli e morfogénese de culturas in vitro</i>	53
2. <i>Determinação do efeito da suplementação hormonal no crescimento de calli não-morfogénico</i>	56
3. <i>Interacção entre 2,4-D, ZEA e GA<sub>3</sub> na indução de diferentes tipos de culturas a partir de segmentos de hipocótilo</i>	57
3.1 <i>Estudo do efeito da suplementação hormonal na indução de embriogénese somática</i>	60
3.2 <i>Capacidade de conversão dos embriões somáticos em plântulas</i>	65
3.3 <i>Embriogénese somática anormal. Fenómenos de foliose</i>	65
<i>Conclusões e perspectivas</i>	70
<i>Bibliografia</i>	71

### *Capítulo III*

---

#### *Diferenças no Conteúdo e Composição de Esteróis Livres Associadas à Embriogénese Somática, Organogénese e Crescimento de Calli.*

<i>Resumo</i>	77
<i>Introdução</i>	79
<i>Material e Métodos</i>	85
1. <i>Material vegetal e condições de cultura</i>	85
1.1. <i>Meios de germinação</i>	85
1.2. <i>Meio de indução morfogénica e material amostrado</i>	86
1.3. <i>Meios de indução de calli não-morfogénicos e método de amostragem ao longo do tempo</i>	86
2. <i>Estudo da fracção esterólica do extracto lipídico</i>	87
2.1 <i>Extracção dos lípidos totais</i>	87
2.2 <i>Derivatização da fracção lipídica e análise da fracção esterólica</i>	88

3. <i>Análise estatística</i>	89
<i>Resultados</i>	93
1. <i>Lípidos totais e esteróis livres em sementes e diferentes tecidos e órgãos de linho regenerados in vitro</i>	91
2. <i>Composição e proporções relativas de esteróis livres em sementes e em plântulas, órgãos e tecidos de linho desenvolvidos in vitro</i>	93
3. <i>Evolução dos conteúdos específicos de esteróis livres durante o crescimento de calli não-morfogénicos: efeito de diferentes suplementações hormonais</i>	97
<i>Discussão</i>	101
<i>Conclusões e perspectivas</i>	105
<i>Bibliografia</i>	107

## *Capítulo IV*

*Influência de Alguns Parâmetros do Meio de Cultura na Embriogénese Somática de Linho (Linum usitatissimum L.): efeito da fonte de carbono, do teor de azoto total, do balanço entre iões nitrato e amónio e da interacção entre níveis de cálcio e zeatina.*

<i>Resumo</i>	113
<i>Introdução</i>	115
<i>Material e Métodos</i>	117
1. <i>Material vegetal e condições de cultura</i>	117
2. <i>Variáveis estimadas e cálculo do rendimento embriogénico</i>	117
3. <i>Tratamentos experimentais</i>	118
3.1 <i>Fontes de carbono</i>	118
3.2 <i>Teor total de azoto (N) inorgânico e balanço entre as formas iónicas (<math>\text{NO}_3^-</math> e <math>\text{NH}_4^+</math>)</i>	118
3.3 <i>Níveis de cálcio e interacção com zeatina</i>	119
4. <i>Análise estatística</i>	119
<i>Resultados e Discussão</i>	121
1. <i>Efeito da fonte de carbono no crescimento de calli e na embriogénese somática</i>	121
2. <i>Efeitos do azoto inorgânico total e do balanço entre os iões nitrato e amónio no crescimento de calli e na embriogénese somática</i>	125
3. <i>Efeitos do teor de cálcio e de ZEA no crescimento de calli e na embriogénese somática</i>	130
<i>Conclusões e perspectivas</i>	136
<i>Bibliografia</i>	137

## Capítulo V

### *Variações dos Lípidos Totais e das Fracções Neutra e Ácida Durante a Embriogénese Somática de Linho (Linum usitatissimum L.):*

#### *I – Variação Ontogénica dos Teores e Composição das Fracções de Ácidos Gordos Livres e Esterificados.*

<i>Resumo</i>	<i>143</i>
<i>Introdução</i>	<i>145</i>
1. <i>A embriogénese somática e o linho como modelos experimentais para o estudo do metabolismo dos lípidos</i>	<i>146</i>
2. <i>Metabolismo dos ácidos gordos nas plantas</i>	<i>147</i>
2.1. <i>Síntese de ácidos gordos</i>	<i>147</i>
2.1.1. <i>Síntese de novo (FAS)</i>	<i>149</i>
2.1.2. <i>Desaturação dos ácidos gordos</i>	<i>150</i>
2.1.3. <i>Elongação dos ácidos gordos (FAE)</i>	<i>151</i>
2.1.4. <i>Síntese de ácidos gordos de cadeia ímpar</i>	<i>151</i>
2.2. <i>Lípidos de membranas</i>	<i>152</i>
2.3. <i>Lípidos de reserva</i>	<i>153</i>
3. <i>Crescimento e embriogénese: produção de lípidos</i>	<i>154</i>
<i>Material e Métodos</i>	<i>157</i>
1. <i>Considerações prévias</i>	<i>157</i>
2. <i>Explantos primários, meio de cultura e condições de crescimento</i>	<i>158</i>
3. <i>Amostragem e descrição do material vegetal usado no estudo da componente lipídica</i>	<i>158</i>
4. <i>Extracção e análise da componente lipídica</i>	<i>160</i>
4.1. <i>Extracção de lípidos totais e obtenção das fracções neutra e ácida</i>	<i>160</i>
4.2. <i>Análise dos ácidos gordos</i>	<i>161</i>
4.2.1. <i>Derivatização da fracção neutra</i>	<i>161</i>
4.2.1.1. <i>Quantificação dos ácidos gordos esterificados</i>	<i>162</i>
4.2.2. <i>Derivatização da fracção ácida</i>	<i>166</i>
4.2.2.1. <i>Quantificação dos ácidos gordos livres</i>	<i>166</i>
5. <i>Análise estatística</i>	<i>169</i>
5.1. <i>Análise de variâncias e análise de regressão</i>	<i>169</i>
5.2. <i>Análise de componentes principais</i>	<i>170</i>
<i>Resultados</i>	<i>171</i>
1. <i>Variação ontogénica dos lípidos totais e das respectivas fracções neutra e ácida</i>	<i>171</i>
2. <i>Ácidos gordos livres (AGL)</i>	<i>174</i>
2.1. <i>Identificação</i>	<i>174</i>
2.2. <i>Variação ontogénica dos teores específicos de cada composto das fracções de AGL</i>	<i>177</i>
2.3. <i>Padrões de variação dos ácidos gordos livres (AGL)</i>	<i>182</i>
2.3.1. <i>Análise de componentes principais dos AGL</i>	<i>182</i>
2.3.2. <i>Análise de componentes principais de parâmetros obtidos a partir de AGL</i>	<i>187</i>
3. <i>Ácidos gordos esterificados (AGE)</i>	<i>190</i>



3.1. Identificação	190
3.2. Variação ontogénica dos teores específicos de cada composto das fracções de AGE	193
3.3. Padrões de variação dos ácidos gordos esterificados (AGE)	200
3.3.1. Análise de componentes principais dos AGE	200
3.3.2. Análise de componentes principais de parâmetros obtidos a partir de AGE	204
<i>Discussão</i>	208
1. Variação ontogénica dos lípidos totais e respectivas fracções neutra e ácida	208
2. Variação dos ácidos gordos livres e ácidos gordos esterificados	210
2.1. Ácidos gordos principais ou mais comuns	211
2.2. Ácidos gordos pouco comuns	214
2.2.1. Ácidos gordos de cadeia ímpar e MCFA	214
2.2.2. VLCFA	215
<i>Conclusões e perspectivas</i>	219
<i>Bibliografia</i>	223

## Capítulo VI

### *Variações dos Lípidos Totais e das Fracções Neutra e Ácida Durante a Embriogénese Somática de Linho (Linum usitatissimum L.):*

#### *II – Variação Ontogénica do Teor, Composição e Distribuição de n-Alcanos.*

<i>Resumo</i>	231
<i>Introdução</i>	233
<i>Material e Métodos</i>	237
1. Explantes primários, meio de cultura e condições de crescimento	237
2. Amostragem e descrição do material vegetal usado para análise química	237
3. Análise de n-alcanos	237
3.1. Identificação e quantificação dos n-alcanos	238
4. Análise estatística	241
<i>Resultados e Discussão</i>	243
1. Variações dos teores específicos de n-alcanos durante a embriogénese somática	243
2. Variações na composição da fracção de n-alcanos e no respectivo perfil de distribuição: diferenças associadas à embriogénese somática e ao crescimento	245
<i>Conclusões e perspectivas</i>	251
<i>Bibliografia</i>	253

## Capítulo VII

<i>Considerações gerais e Perspectivas futuras</i>	257
--	-----

### Apêndices

<i>Apêndice A - Composição e preparação dos meios de cultura</i>	263
1. <i>Composição do meio base de Murashige e Skoog (MS)</i>	263
2. <i>Preparação do meio MS</i>	263
3. <i>Preparação e manutenção das culturas de tecidos in vitro</i>	264
<i>Apêndice B - Análise estatística</i>	265
1. <i>Análise de variâncias (ANOVA)</i>	265
2. <i>Testes de comparações múltiplas</i>	265
3. <i>Validade da ANOVA e transformações de variáveis</i>	266
4. <i>Variáveis não-contínuas, distribuições não-normais e aproximações</i>	266
5. <i>Análise de correlação e de regressão</i>	267
6. <i>Níveis de significância (<math>\alpha</math>) e valor de P</i>	268
7. <i>Análise de componentes principais (PCA)</i>	268
<i>Bibliografia</i>	269
<i>Apêndice C - Matrizes de correlação das análises de componentes principais (PCA)</i>	271
1. <i>PCA aplicada ao estudo da variação ontogénica dos ácidos gordos livres (AGL)</i>	271
2. <i>PCA aplicada ao estudo da variação ontogénica dos ácidos gordos esterificados (AGE)</i>	273

## Resumo

Culturas *in vitro* de linho (*Linum usitatissimum* L.) foram estabelecidas em meio sólido de Murashige e Skoog (MS) (1). A formação de *callus* e a sua capacidade morfogénica foram testadas em diferentes tipos de explante primário e os efeitos de diferentes combinações hormonais na indução de *calli*, organogénese e embriogénese somática foram estudados. Para as condições testadas, a combinação hormonal ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + zeatina (ZEA) foi a mais eficiente na indução e crescimento de *calli*. Este apresentou-se clorofilino, compacto e sem capacidade rizogénica. Em contraste, em concentrações semelhantes, ácido 3-indole-butírico (IBA) + cinetina (KIN) induziram *calli* friáveis, esbranquiçados, com boa capacidade rizogénica (60 %). Uma experiência factorial incompleta onde se testaram diferentes combinações de 2,4-D + ZEA + ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), a diferentes níveis, revelou que a direcção de diferenciação do explante era determinada por interacções e concentrações específicas dos reguladores de crescimento. Os resultados desta experiência mostraram que a via organogénica (diferenciação de raízes *versus* diferenciação de rebentos caulinares) pode ser manipulada nos explantes de linho aumentando o nível de 2,4-D de 0,05 a 3,2 mg/l no meio de indução. A indução e desenvolvimento de embriões somáticos foi possível numa gama de concentrações de 2,4-D + ZEA na vizinhança de 0,4 e 1,6 mg/l, sendo esta combinação a mais eficiente.

Com o objectivo de optimizar o processo de embriogénese somática a partir de explantes sub-cotiledonares de linho, o tipo de explante primário mais adequado para esta finalidade, os efeitos de diferentes tipos e concentrações de fonte de carbono, concentração de azoto inorgânico total, proporção entre nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), e interacção entre diferentes concentrações de cálcio e ZEA foram estudados em 3 experiências factoriais completas. Meio MS (1) suplementado com os monossacarídeos glucose e frutose em elevadas concentrações (4 %) deram consistentemente culturas altamente embriogénicas, com elevada produção de embriões somáticos (ES) e elevadas taxas de crescimento, quando comparadas com meios suplementados com sacarose ou maltose. Embora a suplementação com maltose tenha dado bons resultados numa gama de concentrações de 1-4 %, o meio suplementado com 4 % de sacarose inibiu a indução e o desenvolvimento de ES. A relação entre as formas iónicas desempenhou um papel determinante na indução de embriogénese somática e no crescimento

dos ES. O nitrato foi importante para o crescimento de *calli* ao passo que, para uma elevada produção de ES, foi importante uma elevada concentração de ião amónio. O compromisso entre o crescimento de *calli* indiferenciado e a embriogénese somática foi determinado por uma interacção entre níveis de cálcio e ZEA muito específica. Uma alta concentração de cálcio associada a uma baixa concentração de ZEA resultou em baixo potencial embriogénico e elevada produção de *calli*. Uma elevada concentração de ZEA foi essencial para o desenvolvimento dos ES.

Usando uma suplementação hormonal para co-indução de embriogénese somática e caulogénese a partir de explantes de hipocótilo de linho foi possível realizar um estudo comparativo, através de análise em GC e GC-MS, sobre o teor e composição de esteróis livres em *calli* não-morfogénicos, caulogénicos e embriogénicos, bem como em rebentos caulinares e ES. Deste estudo constatou-se que ocorria um aumento no teor de esteróis livres nos *calli* morfogenicamente competentes e um aumento na razão estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol nas estruturas regeneradas. Em contrapartida, em *calli* não-morfogénicos, esta razão diminuiu durante a respectiva fase exponencial de crescimento devido ao aumento drástico de  $\beta$ -sitosterol. Este efeito, tal como o crescimento de *calli*, foi maior com 0,5 mg/l de 2,4-D do que com 0,6 mg/l de IBA.

O conteúdo das fracções totais, neutras e ácidas dos extractos lipídicos bem como os conteúdos e composições das fracções de *n*-alcanos, ácidos gordos livres e esterificados, de amostras obtidas em diferentes estágios de desenvolvimento de culturas embriogénicas, foram estudados por GC e GC-MS. Durante a indução e desenvolvimento de *callus* a partir de segmentos sub-cotiledonares constatou-se que a percentagem de lípidos totais diminuía. Em todos os tipos de tecido – segmentos sub-cotiledonares (SH), SH com *callus* nas superfícies de corte (SHC), *calli* embriogénicos (CE), não-embriogénicos (CNE) e embriões somáticos (ES) – foi encontrada uma distribuição de *n*-alcanos tipo normal assimétrica na gama C<sub>13</sub>-C<sub>21</sub>. O teor mais elevado ocorreu nos explantes primários (SH) e em SHC. Alcanos de cadeia mais longa foram observados apenas em tecidos diferenciados tais como hipocótilos e ES. Nos *calli* e ES o teor destes compostos diminuiu com o tempo, tendo essa diminuição sido mais significativa em CE que em CNE, independentemente do tempo em cultura. Este resultado sugere a utilização de *n*-alcanos para o crescimento celular e a sua mobilização dos CE para os ES emergentes.

As análises estatísticas e multivariadas utilizadas para a análise dos resultados obtidos para as fracções ácidas revelaram que ocorreu um incremento acentuado no teor em ácidos gordos (AG) (livres e esterificados) associada com a indução e desenvolvimento de *calli*. Diferenças

significativas relacionadas com a capacidade embriogénica, com a fase de crescimento de *calli* e com a fase de desenvolvimento dos ES em cultura foram também registadas. Culturas diferentes apresentaram diferentes composições em AG. O padrão de variação das razões 18:3/18:2 e 18:0/18:3 sugere que estas possam ser utilizadas como potenciais marcadores da capacidade fotoautotrófica de ES e da capacidade embriogénica de *calli*, respectivamente.

1. Murashige T. e Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.



## Abstract

*In vitro* cultures of flax (*Linum usitatissimum* L. ) were established on basal Murashige and Skoog (MS) (1) medium. The morphogenic and *callus* formation capacity were assessed for different types of flax explant sources and the effects of plant growth regulators (PGR) on *calli* induction, organogenesis and somatic embryogenesis were studied. Under the experimental conditions tested, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + zeatin (ZEA) was the most efficient PGR combination on *calli* induction and biomass production. The *calli* were green but with no rhizogenic capacity. In contrast, and at similar concentrations, indole-3-butyric acid (IBA) + kinetin (KIN) induced white or pale green friable *calli* with a good root regeneration capacity (60 %). A factorial experiment with different combinations of 2,4-D + ZEA + gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) levels revealed that the direction of explant differentiation was determined by specific PGR interactions and concentrations. The results from these experiments revealed that the organogenic pathway (shoot *versus* root differentiation) can be manipulated on flax explants by raising the 2,4-D level from 0.05 to 3.2 mg/l in the induction medium. The induction and the development of somatic embryos from explants was possible in a range of 2,4-D + ZEA concentrations surrounding 0.4 mg/l 2,4-D and 1.6 mg/l ZEA, the most efficient growth regulator combination for this purpose.

Having in view the optimization of the somatic embryogenesis process from flax hypocotyl explants, the best type of primary explant from those tested for this purpose, the effects of different types and levels of carbon source, total inorganic nitrogen concentration, nitrate to ammonium ratio and the interaction between calcium and ZEA levels were studied in three independent factorial experiments. MS medium supplemented with the monosaccharides glucose and fructose at high concentrations (4 %) gave consistently highly embryogenic cultures, with higher somatic embryo frequencies and higher growth rates when compared with media supplemented with sucrose and maltose. Although media with maltose had performed well in a 1-4 % concentration range, media supplemented with sucrose at 4 %, appeared to inhibit the induction and development of somatic embryos. Independently of the effect of the nitrogen content, the balance between both ionic forms (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) played a dramatic role on the induction of somatic embryogenesis and somatic embryo growth. Nitrate is important for

*calli* differentiation and growth, and a high ammonium content increased somatic embryo frequency. The embryogenic vs. undifferentiated cell growth commitment of flax explants was determined by interaction between calcium and ZEA levels, a high calcium/low ZEA affording very low embryogenic potential and high *calli* biomass. A high ZEA concentration was essential for the normal development of somatic embryos.

Using a single medium hormonal variant for induction and development of somatic embryogenesis and shoot organogenesis from flax hypocotyls, a comparative study was performed, through analysis by GC and GC-MS, to determine the free sterols content and composition in non-morphogenic, shoot organogenic and embryogenic *calli* as well as in regenerated shoots and somatic embryos. The induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis of flax was associated with an increase of total sterols in the competent *calli* and an increased ratio of stigmasterol to  $\beta$ -sitosterol in derived embryos and shoots. On the contrary, in non-morphogenic *calli*, the ratio stigmasterol to  $\beta$ -sitosterol decreased during the exponential growth phase due to a drastic rise in the  $\beta$ -sitosterol content. This effect as well as the *calli* growth were higher with 0.5 mg/l 2,4-D than with 0.6 mg/l IBA.

The content of total, neutral and acid fractions of lipidic extracts as well as the contents and composition of hydrocarbons, esterified and free fatty acids fractions, sampled at different developmental stages, were studied by GC and GC-MS. During induction and development of *callus* from hypocotyl tissues, a decrease in the percentage of total lipids was observed. In all types of tissue sampled - hypocotyl segments (SH) used as primary explants, SH with differentiating *calli* at the cut ends (SHC), embryogenic (CE) and non-embryogenic *calli* (CNE) and somatic embryos (ES) – a skewed-normal distribution of *n*-alkanes with a low mass range ( $C_{13}$ - $C_{21}$ ) was found. The highest content of *n*-alkanes occurred in the primary hypocotyl explant and in the early stages of *callus* development. Longer carbon chain *n*-alkanes were observed only in the mature or differentiated tissues of hypocotyls and ES. Although the *n*-alkane contents decreased with time, in ES and *calli*, a significant lower *n*-alkane content was observed in CE when compared to CNE independent of time in culture. These results suggest the utilisation of *n*-alkanes for heterotrophic cellular growth as well as its mobilisation from CE to developing ES. The statistical and multivariate analyses performed to analyse the bulk results obtained for the fatty acid fractions revealed that there was a high increment in the AG content (free and sterified) associated with the induction and development of *calli* from SH explants. Significant differences related to *calli* embryogenic capacity and growth phase and to the development of somatic embryos in culture were also found. Various groups of fatty acids,

namely, polyunsaturated fatty acids, very long chain and medium chain fatty acids were responsible for those differences. Different cultures have shown distinct AG compositions. The variation pattern presented by 18:3/18:2 and 18:0/18:3 suggest a role for these ratios as markers of ES photoautotrophy and *calli* growth phase and of *calli* embryogenic capacity, respectively.

1. Murashige T. e Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.

## Abreviaturas e nomenclatura

- 2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
ACCase – Acetil-CoA-carboxilase (Acetil-CoA Carboxilase)  
ACP – Proteína transportadora de grupos acil (Acyl-Carrier Protein)  
AG – Ácidos gordos  
AGE – Ácidos gordos esterificados  
AGL – Ácidos gordos livres  
ANOVA – Análise de variâncias (ANalysis Of VAriance)  
C – Carbono  
C<sub>n</sub> – Ácido gordo constituído por uma cadeia com n átomos de carbono  
CE – *Calli* embriogénicos  
CNE – *Calli* não-embriogénicos ou não-morfogénicos (o primeiro significado é utilizado em ensaios de embriogénese somática enquanto que o segundo é usado em ensaios onde se estudaram outras vias morfológicas)  
CoA – Coenzima A  
CV – Coeficiente de variação (= SD/X)  
DAA – Dias após antese (Days After Anthesis)  
DAG - Diacilglicerol  
DGDG – Digalactosildiacilglicerol  
DR – Discriminação relativa  
EI – Impacto electrónico (Electronic Impact)  
E<sub>i</sub> – Valor esperado de determinado composto padrão i (estimado a partir da massa e área de p.i. assumindo que o FR do composto i ao padrão é igual à unidade)  
EPA – Ácido eicosapentaenóico (5,8,11,14,17-*cis*-EicosaPentaenoic Acid)  
ES – Embriões somáticos  
FA – Análise de factores (Factor Analysis)  
FAE – Elongação dos ácidos gordos (Fatty Acid Elongation)  
FAME – Ésteres metílicos de ácidos gordos (Fatty Acid Methyl Esters)  
FAO – Food and Agriculture Organization  
FAS – Sintetases dos ácidos gordos (Fatty Acid Synthases) ou a via metabólica que conduz à síntese *de novo* de ácidos gordos  
FatA e FatB – Tioesterases de ácidos gordos tipo A e tipo B (Fatty acid thioesterase)  
FC – Factor de correção  
FID – Detector de ionização de chama (Flame Ionization Detector)  
FR – Factor de resposta  
GA<sub>3</sub> – Ácido giberélico  
G3P – Glicerol-3 fosfato  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio  
IBA – Ácido 3-indol-butírico  
ID – Diâmetro interno (Internal diameter)  
KIN – Cinetina  
LCFA – Ácidos gordos de cadeia longa (Long Chain Fatty Acids)  
LOX – Lipoxigenase  
MCFA – Ácidos gordos de cadeia média (Medium Chain Fatty Acids)  
MGDG – Monogalactosildiacilglicerol  
MS – Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)  
NAA – Ácido α-naftalenacético  
NAD<sup>+</sup>/NADH<sub>2</sub> – Nicotinaminadinucleótido forma oxidada/forma reduzida  
O<sub>i</sub> – Valor observado de determinado composto padrão i (área absoluta do pico cromatográfico)

p.i. – Padrão interno  
 PA – Ácido fosfatídico (Phosphatidic Acid)  
 PC – Fosfatidilcolina (PhosphatidylCholine)  
 PCA – Análise de componentes principais (Principal Components Analysis)  
 PE – Fosfatidiletanolamina (PhosphatidylEthanolamine)  
 PG – Fosfatidilglicerol (PhosphatidylGlycerol)  
 PI – Fosfatidilinositol (PhosphatidylInositol)  
 PS – Fosfatidilserina (PhosphatidylSerine)  
 PUFA – Ácidos gordos polinsaturados (PolyUnsaturated Fatty Acids)  
 r - Coeficiente de correlação  
 $r^2$  – Coeficiente de determinação  
 RE – Retículo endoplasmático rugoso  
 SC - Segmento nodal contendo o par de cotilédones  
 SCFA - Ácidos gordos de cadeia curta (Short Chain Fatty Acids)  
 SD – Desvio padrão (Standard Deviation)  
 SDG – Sulfoquinovosildiacilglicerol  
 SE – Erro padrão da média (Standard Error)  
 SEM – Microscópio electrónico de varrimento (Scanning Electron Microscope)  
 SH – Segmentos de hipocótilo  
 SHC – Segmentos de hipocótilo com diferenciação de *callus* nas superfícies de corte  
 SR – Segmentos de raízes primárias  
 TAG – Triacilgliceróis (Triacylglycerols)  
 TDZ - Tidiazuron  
 TR – Tempo de retenção  
 VLCFA - Ácidos gordos de cadeia muito longa (Very Long Chain Fatty Acids)  
 X – Valor médio  
 ZEA – Zeatina

**Nota: algumas abreviaturas utilizadas foram adoptadas da língua inglesa por motivos que se prendem com a universalidade dessas siglas na linguagem científica.**



*I*

---

*Introdução Geral*

## *Ficha histórico-cultural: o linho em Portugal*



A cultura do linho tem uma enorme tradição em Portugal, constituindo uma parte inalienável do seu património cultural e etnográfico. No entanto, apenas a utilização da fibra do linho teve um impacto significativo na economia portuguesa.

Em Portugal, o primeiro indício da utilização do linho surge na Idade da Pedra Polida (neolítica), com a descoberta de *fusaiolas* e *cossoiros* em castros pré-romanos. Estas peças eram utilizadas, respectivamente, na fiação e como pesos para teares verticais rudimentares.

Antes portanto da chegada dos romanos à península (séc. III a.C.), já os lusitanos manufacturavam o linho. Plínio (escritor romano do séc. I) menciona o linho *Zoelicum* da Galícia, o que levou Duarte Nunes de Lião (escritor seiscentista) a escrever: “*E Plínio (...) conta que em huma cidade da Galliza que se chamava Zoclia, se se dava hum genero de linho de que se faziam linhas para redes de pescar e outras cousas de tanta rizeja que os romanos levaram a semente delle para Itália e lhe chamavam Zodico*”. E com toda a natural boa vontade de patriota... “*E lançada bem a conta por os sinais que Plínio dá, ou esta cidade era Guimarães, ou estava perto donde Guimarães agora stâ...*”.

Depois das conquistas, todo o mundo trabalhava para esta cultura que sentiu grandes progressos, sendo o linho proveniente da Península Ibérica o mais apreciado na Europa. As invasões bárbaras (séc. V) e árabes (séc. VIII) vieram alterar profundamente a civilização florescente na Hispania mas, mesmo assim, o linho era ainda nesta altura, um dos principais produtos da terra e rendimento da lavoura.

A cultura do linho em Portugal foi sempre muito importante e protegida, antes mesmo do início do primeiro reinado. Em 1128, D. Afonso Henriques isentou de pagamento os

mercadores de linho e D. Afonso III criou mesmo uma feira junto ao castelo. No reinado de D. Dinis a cultura do linho conheceu um incremento notável, tendo sido aumentada grandemente a respectiva área de cultivo e a sua manufactura. Este monarca estabeleceu feiras francas e o desenvolvimento que imprimiu à navegação fez aumentar as trocas comerciais com o estrangeiro.

No séc. XIV, a indústria do linho fazia-se em Portugal em larga escala. De norte a sul não havia lavrador que não cultivasse o linho, mulher que o não fiasse e aldeia, por mais pobre, que não tivesse um ou mais teares. Apesar de ser uma indústria essencialmente caseira, no séc. XV a indústria do linho representava grande valor na economia nacional.

E assim se chegou ao reinado de D. Manuel I (séc. XVI). Começou então a dar-se a grande sangria da raça com as descobertas e conquistas do além. O português deixou a agricultura, os campos desertaram-se. Porém, se no país em geral, o desinteresse pela indústria era agravado pelos ideais de expansão comercial, Lamego (1533), Guimarães e arredores continuaram a ser núcleos linheiros importantíssimos e os seus panos e linhas finíssimas tinham fama além-fronteiras. Desse modo, e apesar do agravamento no desenvolvimento se ter arrastado nos sucessivos reinados, o linho nacional representaria ainda um grande valor. Guimarães, Coimbra, Tentúgal, Góis, Lafões, Arouca e Braga apresentavam-se com grande soma de bom pano.

Nos reinados de D. João V e D. José I foi feito grande esforço no desenvolvimento da indústria linícola, mas eis que a decadência se acentuou, no séc XVIII, com a invasão do mercado pelo algodão, mais barato e de fiação mais fácil. A fiação mecânica (inventada em França em 1810) do linho só chegaria a Portugal, com a fundação da fábrica de Tôrres Novas, em 1845! Nos fins do séc XIX, a grande indústria era apenas representada por aquela fábrica de fiação e tecidos mas, a pequena indústria era ainda exercida em larga escala em todos os distritos do reino, com especial relevo no norte do país, nos distritos de Viana, Braga, Porto e Vila Real, mas também em Aveiro, Viseu, Coimbra, Castelo Branco, Leiria, Lisboa e Portalegre.

A cultura do linho, ou melhor, a tradição linheira ficou com o passar dos tempos profundamente enraizada na cultura popular do povo português.

E de tão geral o uso de vestir linho, nasceu o aforismo:

*“Homem dentre Douro e Minho,  
calça da pao, veste de linho  
.....”*

E de tanto fio fiar - há quem diga até, que a roca foi prenda de casamento das raparigas da lavoura – nasceram lamentos e cantigas das fiadeiras:

*- “Ó minha mãe:  
que coisa é casar?  
- Parir, criar, fiar”.*

*“À minha roca e ao fuso,  
Tênh-l’ um ódio mortal;  
Aí vem minha comadre,  
Que sofre do mesmo mal”.*

Umas mais brejeiras,

*“Eu vou-me por quí abaixo,  
A fiar a minha roca;  
O ladrão do pintassilgo,  
Cagou-me na maçaroca”.*

mas outras de extraordinária beleza,

*“Quem me dera ser o linho,  
Que vós na roca fiaís;  
Quem me dera tantos beijos  
Como vós no linho daís”.*

numa alusão ao gesto da fiadeira que leva a filaça aos beijos e a humedece com *escupe* para melhor torcer o fio.

As informações presentes nesta ficha foram recolhidas em registos bibliográficos da primeira metade do séc. XX presentes na colecção da biblioteca da Estação Agronómica Nacional em Oeiras.

- **“Cultura do Linho”** – Dissertação inaugural apresentada por Annibal F.B. Fonseca ao Conselho Escolar do Instituto de Agronomia e Veterinária. Ateliers Graphicos Brito Nogueira, Lisboa, 1904, pp. 15-35.
- **“A Vida do Linho”** – Monografia apresentada por Conde D’Aurora ao Congresso do Linho e da Lã realizado em Barcelos em Setembro de 1931. Lisboa, 1934, pp. 1-13.
- **“Breve História do Linho”** – Iniciação, Cadernos de Informação Cultural. Lisboa, 1940, pp. 27.
- **“Os Mesteres de Guimarães II. Estudo Histórico e Etnográfico do Linho”** – A.L. de Carvalho para o Ministério da Economia. Companhia Editora do Minho, Barcelos, 1941, pp. 7-186.
- **“O Linho em Portugal”** - Ministério da Economia, Direcção Geral dos Serviços Agrícolas. Serviço Editorial da Repartição de Estudos, Informação e Propaganda. Sociedade Astória, LDA., Lisboa, 1943, pp. 5-31.



## Ficha técnica do linho



### 1 – Descrição sumária

O linho comum é o nome vulgar da espécie *Linum usitatissimum* L. da qual fazem parte numerosas variedades cultiváveis.

#### 1.1 – Posição sistemática (1, 2)

Reino – Plantae

Filo – Anthophyta (= Angiospermophyta)

Classe – Rosidae

Ordem – Linales

Família – Linaceae

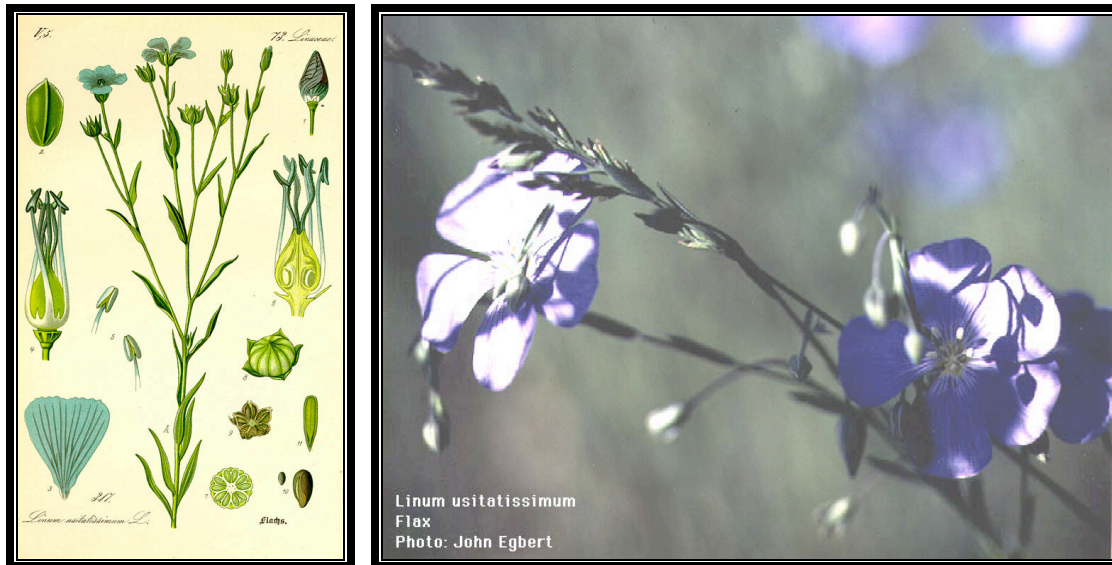
Género – *Linum*

Espécie – *Linum usitatissimum* L., 1753

#### 1.2 – Morfologia e hábito

Planta anual, erecta e glabra; caule verde-acinzentado de 0,75-1,2 m de altura, ramificado na zona superior; folhas alternas, linear-lanceoladas, achatadas e glaucas; raíz aprumada; flores hermafroditas, nascem na zona terminal dos ramos folhosos, 5 sépalas inteiras ovada-oblongas de 5-7 mm de comprimento, 5 pétalas azuis, brancas ou rosa pálido de 1 cm comprimento; os frutos são cápsulas com 5 lóculos, globoso-ovóides de 7-10 mm, indeiscentes, possuem até 10 sementes/cápsula; sementes amareladas, castanhas claras ou escuras, brilhantes, achatadas e ovais, de peso variável 3-12 g/1000 sementes (3).

## 2 – Imagens do linho



Imagens de plantas e peças anatómicas de *Linum usitatissimum* L. pertencentes à Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885) do Prof. Dr. Otto Wilhem Thomé disponibilizada na Kurt Stubbers Online Library por Kurt Stubber (1999) (2) e das suas flores azuis (2).



Imagens de culturas de *Linum usitatissimum* L. para obtenção de fibra (à esquerda) e de óleo (à direita) de M. Kalda, MPI Colónia (2).

### 3 – Origem e expansão

O linho comum (*Linum usitatissimum* L.), o centeio e o trigo foram as primeiras espécies a ser domesticadas pelo Homem. O linho era já cultivado há 6000 - 8000 anos no Egipto e Suméria e foi trazido para a Europa durante a Idade da Pedra (3000 a.C.). Pensa-se que *L. angustifolium*, também chamado linho antigo, espécie de folha perene e com cápsula deiscente que veio para o mediterrâneo a partir do sudoeste asiático, constitua a forma mais ancestral, e que as diferentes variedades conhecidas tenham sido desenvolvidas por selecção para a produção de óleo (cápsula indeiscente), de fibra ou mista. Apesar de haver alguma controvérsia sobre a origem do linho actual, pensa-se que tenha surgido na região mediterrânica.

O uso do linho têxtil foi primeiramente registado no Egipto, onde se usavam panos de linho para envolver as múmias, mas rapidamente se expandiu para os vários pontos do globo. Os primeiros registos sobre a utilização do linho na Europa são da Idade da Pedra e vêm da região do Lago Dweller na Suíça, onde as populações lacustres já cultivavam o linho para a produção de fibra e de semente. À Península Ibérica, e nomeadamente a Portugal, o linho chegou no neolítico e nos Estados Unidos a produção comercial data de 1753. Contudo, a descoberta da fibra de algodão em 1793, fez diminuir grandemente a produção do linho têxtil (4). Actualmente, e de acordo com dados de 1999 obtidos a partir do relatório da Euroflax (5), os maiores produtores mundiais de linho para fibra (do inglês “fibre flax”) são a França (49129 ha), a Rússia (103610 ha), a Espanha (122400 ha) e a China (101000 ha), tendo Portugal uma área cultivada de 4678 ha. Relativamente ao linho para óleo (do inglês “linseed”), os países com maior área cultivada foram a Argentina (101000 ha), o Canadá (811500 ha), a China (570000 ha), a Índia (930000 ha), os Estados Unidos da América (135170 ha), a Alemanha (110048 ha) e o Reino Unido (101000 ha), não apresentando Portugal expressão significativa.

### 4 – Variedades de linho e exigências da cultura

As variedades de linho dividem-se em 2 tipos: os “linhos” de *primavera*, também denominados frios ou serôdios, e os “linhos” de *inverno*, quentes ou temporões (3). Os

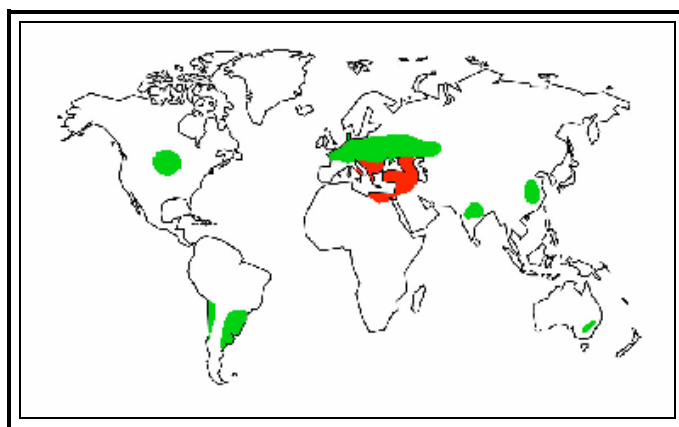
“linhos” de *primavera* semeiam-se em Abril/Maio e os de *inverno* em Setembro/Outubro.

As variedades de linho mais cultivadas em Portugal são o *mourisco* (linho de inverno), o *galego* e o *Riga nacional* ou *coimbrão* (linhos de primavera) (4). O primeiro é mais utilizado para produção de semente e os outros dois para fibra. O linho colhido para a *filassa* (fibra) é apanhado antes da maturação da *baganha* (cápsula), portanto se se quer a filassa tem de se deixar o linho secar em pé (3).

O linho requer solos ricos, profundos, porosos e muito irrigados. O linho para produção de óleo requer climas mais quentes e menor humidade que o linho para fibra.

### 5 – Distribuição geográfica

O linho tem sido cultivado no Egipto, Síria e Mesopotâmia por mais de 5000 anos. Actualmente, as áreas mais importantes na produção do linho são a Europa, Rússia, China, Índia, América do Norte e Argentina.



Distribuição geográfica das regiões onde se cultiva (a verde) e de onde é originário o linho (a vermelho) (2).

### 6 – Usos

A cultura do linho para obtenção de fibra é praticamente toda absorvida pela indústria têxtil, mas as fibras são também utilizadas para o fabrico de materiais isolantes e de papel. Para além da fibra o linho é produzido pelo seu óleo.

O óleo de linho (*ca.* de 40 % da biomassa da semente) tem sido usado primeiramente como aditivo de tintas, vernizes, lacas e na produção de linóleo, mas também em tintas

de impressão, impermeabilizantes e para produção de sabões. Mais recentemente, e por erosão dos mercados acima referidos pela introdução das resinas sintéticas e do látex, o óleo do linho tem sido utilizado no tratamento de betão armado usado em pavimentação.

Devido ao seu elevado teor proteico (20 – 30 %), as sementes de linho têm sido largamente utilizadas na alimentação animal. Mas o seu alto valor em ácidos gordos polinsaturados (> 60 % dos ácidos totais) tem suscitado interesse para a indústria alimentar humana.

As plantas do género *Linum* são reconhecidas desde há longa data, como apresentando propriedades adstringentes, diuréticas, emolientes, expectorantes, laxativas e supurativas entre muitas outras. Têm sido por isso muito utilizadas em medicina popular para curar bronquites, queimaduras, carbúnculo, constipações, conjuntivites, diarreias, gonorreia, gota, inflamações reumatismos, escleroses, inchaços, tumores e até alguns cancros. A propósito desta propriedade foi interessante ter-se encontrado no linho compostos como a podofilotoxina e o  $\beta$ -sitosterol, reconhecidos agentes anti-carcinogénicos (3, 4).

As informações presentes nesta ficha foram obtidas essencialmente a partir de dados genéricos compilados em bases de texto e imagens por diferentes autores/instituições e disponibilizados para a internet.

- 1 **Margulis** L. e **Schwartz** K.V. Five Kingdoms. An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, 3<sup>rd</sup> Edition, WH Freeman & Company, New York, 1998, pp. 369-450.
- 2 **Botanical Image Gallery** da Botanical Image Database da Universidade de Basel (Suíça) Botanique Online da Universidade de Hamburgo – <http://www.rrz.uni-hamburg.de/biologie/b-online/>
- 3 **Duke** J.A. (1983) Handbook of Energy Crops. *Linum usitatissimum* L. – [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Linum\\_usitatissimum.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Linum_usitatissimum.html)
- 4 **Oplinger** E.S., **Oelke** E.A., **Doll** J.D., **Bundy** L.G. e **Schuler** R.T. (1989) Alternative Field Crops Manual . Flax. – <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/flax.html>
- 5 **Euroflax Newsletter**. Information Bulletin of the FAO European Cooperative Research Network on Flax and Other Blast Plants, nº 2(14), 2000.

## *Enquadramento geral do tema*

### *Contexto das actividades de investigação e desenvolvimento sobre o linho*

O linho (*Linum usitatissimum* L.) é uma espécie agronómica de grande impacto económico largamente utilizada para produção de fibra e óleo. Histologicamente, as fibras de linho são longas fibras floémicas localizadas no parênquima floémico dos caules da planta. O óleo, particularmente abundante na semente, é constituído essencialmente por lípidos neutros ricos em ácido linolénico.

A maioria do vasto número de trabalhos de investigação sobre o linho prende-se com a avaliação e o melhoramento das culturas do ponto de vista agronómico, designadamente, no que diz respeito a resistência a agentes patogénicos (1, 2, 3, 4) e herbicidas (5, 6), adaptabilidade às condições edafo-climáticas (7, 8, 9, 10), rendimento em fibra e semente (11, 12, 13, 14) e qualidade do óleo (15); a caracterização e controlo da composição lipídica dos diferentes génotipos selvagens (16, 17, 18) e mutantes (19); a sua utilização em nutrição animal (20, 21); como fonte de compostos com actividade biológica (22) ou com efeitos em processos celulares (23, 24). Estudos visando o melhoramento da espécie do ponto de vista da qualidade do óleo com vista à sua introdução na indústria alimentar têm, também, vindo a ser realizados. Por manipulação de germoplasma através de métodos clássicos, foram seleccionados mutantes com muito baixo teor de ácido linolénico nas sementes (19, 25), condição considerada essencial para a utilização do óleo de sementes de linho como óleo de qualidade alimentar, visto este ácido gordo polinsaturado se auto-oxidar facilmente produzindo rancidez (26).

O estatuto do linho como espécie de grande importância económica, científica e tecnológica tem sido bem patenteada, designadamente pela rede internacional **Euroflax**, constituída no âmbito da ESCORENA (European System of Cooperative Research Networks in Agriculture da FAO) (27). Esta rede congrega vários países, incluindo Portugal, e especialistas organizados em 6 grupos de trabalho que têm por missão organizar, desenvolver e coordenar projectos de investigação e desenvolvimento nas

áreas de: “Melhoramento e Recursos Genéticos de Plantas”, “Extracção e Processamento”, “Economia e Marketing”, “Qualidade”, “Aplicações Não-Têxteis” e “Biologia e Biotecnologia”. Desenvolver e sistematizar o conhecimento e a informação sobre a espécie, na perspectiva de explorar melhor as potencialidades genéticas e o rendimento tecnológico e de ampliar as áreas de aplicação dos produtos derivados do linho, são os objectivos principais desta rede.

### *Cultura de tecidos in vitro: uma arte. Alguns conceitos básicos*

O sucesso da investigação científica ou científico-tecnológica, assim como o sucesso do sector produtivo, passa pelo controlo e reprodutibilidade dos processos ou sistemas em questão. No que diz respeito ao melhoramento de plantas e ao estudo dos compostos por elas produzidos, as técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* vieram dar um contributo decisivo.

A investigação científica moderna ampliou os métodos pelos quais as plantas podem ser propagadas vegetativamente. A propagação por **cultura de tecidos**, ou micropropagação, consiste na multiplicação de plantas em condições de laboratório, também denominada de condições *in vitro* visto as culturas serem mantidas literalmente em recipientes de vidro (28). Geralmente, inicia-se o processo com a obtenção de “explantes” assépticos – pequena porção da planta que se quer propagar – e a sua transferência para um meio nutricional, consistindo normalmente de uma solução de macro- e micronutrientes, na forma de sais minerais, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crescimento e uma fonte de carbono e energia – o meio de cultura. As plântulas ou rebentos obtidos em tais condições são retirados de cultura para condições de aclimação – condições *ex vitro* – de modo a se adaptarem às condições do meio exterior – condições *in vivo*.

Em condições *in vitro* é possível obter, quer “crescimento organizado”, que contribui para a formação e/ou manutenção de estruturas definidas, como por exemplo a formação de plântulas ou manutenção de raízes isoladas em cultura, quer “crescimento não-organizado”. No primeiro caso, pode ocorrer directamente a partir de meristemas existentes no explante – caso da cultura de raízes – ou meristemas adventícios induzidos no mesmo; ou indirectamente a partir de tecidos não-organizados – *calli* – formados



previamente por desdiferenciação do explante primário. Este processo de formação *de novo* de órgãos ou estruturas diferenciadas denomina-se “**morfogénese**” (o “desenvolvimento de forma”) (28). Quando o processo morfogénico resulta na produção de órgãos como, por exemplo, raízes ou “rebentos caulinares” (“do inglês “shoots”) designa-se “**organogénese**”, quando resulta na produção de “embriões somáticos”, designa-se “**embriogénese somática**”. A formação de tecidos não-organizados, evento raro na natureza, é frequente em cultura *in vitro*. Tipicamente, estes tecidos consistem numa massa amorfa de células parenquimatosas (29) e possuem um número limitado de tipos celulares especializados ou diferenciados. Os tecidos ou células indiferenciadas podem ser propagados em meio de cultura por períodos muito longos. Os tecidos não-organizados induzidos em meio sólido *in vitro* – **cultura de calli** – podem dar origem a culturas de células em meio líquido – culturas de “células em suspensão”.

A expressão “cultura de tecidos” é vulgarmente utilizada como um termo colectivo para designar todos os tipos de culturas que se podem manter ou induzir *in vitro*. Existem vários tipos de culturas no que diz respeito ao tipo de “explante primário” e ao tipo de cultura produzida *in vitro*, assim como uma grande diversidade de técnicas, meios de cultura e condições experimentais associadas à cultura de tecidos *in vitro*. Por este motivo, referiremos apenas as mais importantes no que diz respeito ao trabalho desenvolvido, destacando-se no texto, os tipos de cultura, processos de propagação/regeneração de plantas e componentes do meio (negrito) e, as expressões da terminologia específica da cultura de tecidos (entre aspas) mais relevantes, recomendando-se a consulta das referências (28, 30) para um conhecimento aprofundado de todos os conceitos, questões e terminologia respeitantes à cultura de tecidos *in vitro*.

A “morfogénese” é também um processo de regeneração de plantas *in vitro* intimamente associado à micropropagação vegetal. A regeneração de plantas através de técnicas de cultura *in vitro* pode ser obtida essencialmente por “organogénese” ou por “embriogénese somática” (29). Por “organogénese directa” quando tem início em meristemas pré-existentes ou em meristemas adventícios, induzidos a partir de células diferenciadas do explante; por “organogénese indirecta” quando tem origem em células indiferenciadas de *callus* ou células em suspensão; por “embriogénese somática directa”



quando tem início em embriões somáticos induzidos a partir de células do explante primário, ou por “embriogénese somática indirecta” se estes forem induzidos em células de *callus* ou em células em suspensão. Os “embriões somáticos” são estruturas organizadas, semelhantes aos embriões zigóticos, que ao contrário das obtidas por organogénese, não possuem continuidade vascular com o explante de que derivaram, podendo ter existência independente (29).

A capacidade apresentada por uma célula para regenerar um novo organismo denomina-se “totipotência” (29). Esta capacidade é característica de células vegetais de tecidos jovens e indiferenciados, pelo que estes tecidos são mais frequentemente utilizados como dadores de “explantes primários” em programas de culturas *in vitro*. No entanto, é também possível obter regeneração a partir de células diferenciadas se estas tiverem capacidade de reverter a um estado meristemático indiferenciado. Teoricamente, devido a esta característica de “totipotência”, todas as plantas, tecidos e células podem ser clonadas através de técnicas de cultura *in vitro*. Na prática porém, verifica-se que isto não tem sido possível em todos os casos devido a problemas no estabelecimento das culturas (ex: necrose por elevada produção e oxidação de fenóis) e variações genéticas na população obtida relativamente à original (variação somaclonal) (28) .

### ***Cultura de callus***

O *callus* (plural *calli*) é, como se referiu, um tecido amorfo e coerente, que se forma quando células se multiplicam de um modo desorganizado. Este tecido indiferenciado pode ocorrer *in vivo*, sob certas condições de stresse. *In vitro* é geralmente induzido colocando explantes num meio de cultura sólido. Sob a influência de “reguladores de crescimento”, o metabolismo das células de explante, num estado quiescente, altera-se e estas entram em divisão activa. Durante este processo de “desdiferenciação”, alguma diferenciação ou especialização celular que o tecido pudesse ter sofrido na planta, é revertida, e o explante dá origem a um novo tecido – o *callus* – composto por células meristemáticas, células indiferenciadas ou parenquimatosas, sem qualquer ordem estrutural característica do tecido ou órgão de que derivou (28).

Uma vez estabelecido, a manutenção do *callus* pode prosseguir numa série de ciclos de crescimento (31). Se em cada ciclo, o crescimento dos *calli* ocorrer apenas de um modo desorganizado, a cultura apresenta 3 fases de desenvolvimento distintas:

- “Fase de latência” – que se caracteriza por uma elevada actividade metabólica (síntese de ATP e de moléculas com elevado poder redutor e carga energética, síntese de proteínas e ácidos nucleicos) de modo a preparar as células para a divisão celular. Nesta fase, o crescimento é virtualmente nulo.
- “Fase de divisão celular” – uma vez induzida a divisão das células, esta fase continuará até um ou mais nutrientes se tornarem limitantes. Geralmente, nesta fase, a cultura apresenta inicialmente um crescimento exponencial, onde a taxa específica de divisão é máxima e constante, caracterizando-se essencialmente por uma elevada actividade respiratória, ao qual se sucede um crescimento linear, onde a taxa específica de crescimento vai diminuindo, mas onde a síntese proteica e de ácidos nucleicos se mantêm ainda elevada.
- “Fase estacionária” – esta fase caracteriza-se pela diminuição progressiva da divisão celular, actividade respiratória, síntese de RNA e proteínas, pelo aumento da expansão e vacuolização celular e pela cessação do crescimento. Nesta fase, é frequente observar-se diferenciação bioquímica, geralmente associada ao metabolismo secundário, e/ou diferenciação estrutural, associada a fenómenos morfogénicos (31).

A manutenção das culturas de *calli* é conseguida por “sub-cultura” de “inóculos” (porções de *callus*) para meio de cultura fresco, constituindo cada inóculo o início de um novo ciclo de crescimento. Convencionalmente, em cultura de *callus*, a sub-cultura é realizada durante a fase estacionária, quando a agregação celular é menor (*calli* menos compactos). O período que decorre entre uma transferência e outra denomina-se “passagem” e o tempo de cada passagem dependerá da taxa de crescimento da cultura. Embora o *callus* se mantenha essencialmente não-organizado durante o crescimento, pode ocorrer especialização de alguns tipos celulares – “diferenciação” – de modo aleatório ou associado a centros de morfogénese, os quais poderão dar origem a órgãos ou a embriões somáticos. Esta produção *de novo* de plântulas a partir de culturas não-organizadas, neste caso de *callus*, é referida como “regeneração” (28).

### ***Morfogénese***

Tecidos ou órgãos com capacidade para morfogénese dizem-se “morfogénicos” (ou morfogenéticos) e os órgãos obtidos *de novo* dizem-se “adventícios”. George (28) refere morfogénese como sinónimo de organogénese mas, como o prefixo deste termo significa “órgão”, adoptou-se, nesta dissertação, o termo morfogénese para designar o fenómeno mais lato de produção de “forma” (estruturas organizadas que podem ser órgãos, embriões, etc, incluindo embriões somáticos) e organogénese para o caso particular de produção de “órgãos”, designadamente, rebentos caulinares (“caulogénese”) e raízes (“rizogénese”).

Rebentos caulinares, raízes e embriões somáticos podem surgir de uma única célula ou grupo de células, que são induzidas, pelas condições culturais, a entrar em divisão celular activa, constituindo meristemas ou centros morfogénicos. A morfogénese tem sido observada em muitas plantas de muitos géneros, havendo, porém, espécies com variedades mais recalcitrantes onde este processo ainda não foi conseguido. Como foi já referido, a morfogénese em sentido lato, pode ser directa ou indirecta. Na prática, contudo, é por vezes difícil distinguir se as estruturas formadas têm origem directamente em células do explante ou em células do *callus* que proliferou, havendo ainda a possibilidade de os dois fenómenos ocorrerem simultaneamente na mesma cultura (32).

As células ou tecidos cultivados *in vitro* que não se mostram morfogénicos, supostamente perderam a totipotência. Considera-se que as células que retêm esta capacidade para a diferenciação celular ou morfogénese, ou que, a tenham adquirido em resposta a um estímulo apropriado, são “competentes”. Um segundo passo na linha do comprometimento de uma célula (ou grupo de células) indiferenciada(s) com a morfogénese, será a “indução” de “determinação”. Diz-se que uma célula é “determinada” quando está comprometida a seguir uma via de desenvolvimento particular geneticamente programada, ou seja, uma determinada via morfogénica, sem a influência de reguladores de crescimento exógenos (33). As células determinadas “diferenciam-se” nas células especializadas de um tecido. Na prática, a aquisição de competência e determinação é difícil de separar. Neste trabalho optou-se por substituir a expressão “(não) competente” por “(sem)/com capacidade”, visto que, no caso dos *calli*

sem morfogénese aparente, não se saber se são competentes mas não determinados, ou se não adquiriram, sequer, competência para a morfogénese. Para aquisição de determinação (adopção de uma programa de desenvolvimento particular), as células não-organizadas necessitam de um estímulo. Esta programação parece ser “induzida” pelo efeito de reguladores de crescimento em combinação com “factores nutricionais” adequados.

A capacidade para a morfogénese varia nas diferentes plantas e entre tecidos da mesma planta. O tamanho e tipo de explante usado para iniciar uma cultura influencia também o seu potencial morfogénico. Pequenos explantes primários só raras vezes apresentam organogénese directa e mais raramente ainda, embriogénese directa, enquanto que explantes primários de grande dimensão, quando colocados em meio de cultura, geralmente produzem, de forma directa, novos rebentos, raízes, embriões e até gomos florais (28).

Os meios de cultura, formulados para favorecer uma rápida proliferação celular e portanto ao aparecimento de *callus* a partir do explante, não são, normalmente, adequados para a indução de morfogénese. No entanto, em culturas de certas plantas, a organogénese indirecta pode ocorrer a partir de *callus* mantidos em cultura por períodos mais ou menos prolongados ou sob determinadas combinações específicas de reguladores de crescimento no meio de cultura. A organogénese indirecta, tal como a directa, envolve uma reprogramação das células já desdiferenciadas ou pode resultar da manutenção, nestas células, dum compromisso com a morfogénese, existente em células nos explantes.

### ***Embriogénese somática***

A embriogénese zigótica é o processo de desenvolvimento que vai desde o zigoto ao embrião maduro presente na semente (34). O zigoto não é, contudo, a única estrutura capaz de originar um embrião. Algumas espécies vegetais têm a capacidade de desenvolver embriões apomíticos, i.e, embriões que não resultaram da fertilização. *In vivo*, a origem destes embriões apomíticos pode ser muito diversa, desde o próprio gametófito feminino, incluindo a oosfera (partenogénese), até células do esporófito que espontaneamente os produzem. *In vitro*, a embriogénese pode também ser induzida a partir de células gametofíticas (androgénese) ou de células somáticas (34). A

embriogénese induzida a partir de células somáticas, fenómeno pouco comum na natureza, denomina-se “embriogénese somática”. A ocorrência de embriogénese somática directa *in vitro*, em tecidos do gametófito, tecidos do esporófito em íntima associação com o gametófito, ou em tecidos recém-formados em consequência da fertilização de gâmetas tem sido descrita (28). De entre os explantes com maior potencial para embriogénese directa incluem-se os micrósporos, tecidos de óvulos, embriões zigóticos ou plântulas jovens (28). Alguns autores sugerem que a embriogénese somática directa ocorre *in vitro* apenas em células pré-determinadas para a embriogénese (35, 36, 37). Contudo, os embriões somáticos podem também ser produzidos indirectamente em tecidos ou células indiferenciados como culturas de *calli* ou células em suspensão.

Por vezes, é difícil distinguir embriogénese somática de caulogénese, seja directa ou indirecta. No entanto, o desenvolvimento anatómico (“ontogenia”) dos embriões pode permitir a sua identificação. O estudo ontogénico de embriões de várias espécies [*Daucus carota* (38, 39); *Ranunculus scleratus* (40); *Pennisetum americanum* (41)] mostraram que estes podem distinguir-se de “rebentos caulinares” por serem bipolares, terem um eixo hipocótilo-radicular e cotilédones (ou um coleóptilo e um escutelo nas monocotiledóneas), um padrão de venação semelhante ao dos embriões zigóticos e não apresentarem ligação vascular aos tecidos maternos. Ao contrário dos meristemas organogénicos, os embriões somáticos ocorrem geralmente à superfície do tecido destacando-se deste facilmente.

Haccius, em 1978, definiu embrião como sendo “um novo indivíduo que surge de uma única célula e que não tem ligação vascular com os tecidos maternos”. De facto, foi já demonstrado, em vários sistemas, que os embriões somáticos podem surgir a partir de uma única célula, directamente nos explantes ou indirectamente a partir de *callus* (42, 43, 44). Neste caso, o processo embriogénico começa com uma alteração no padrão regular de divisão celular, em que uma divisão periclinal desigual (45), resulta em dois tipos de células diferentes – uma terminal, mais pequena, com citoplasma denso, que dará origem ao embrião propriamente dito; e uma basal, maior e mais vacuolizada, que poderá dar origem ao suspensor. Verificou-se, no entanto, que os embriões somáticos podem surgir não de uma célula, mas de agregados globulares de tecido ou complexos celulares pró-embrionários. Este fenómeno tem sido comparado ao fenómeno de

poliembrionia (divisão do zigoto ou pró-embrião em vários embriões) que ocorre *in vivo* e que é bastante vulgar em Pinacea. Pode sempre argumentar-se, contudo, que a origem desse aglomerado é numa única célula embriogenicamente pré-determinada. Outros autores mantêm a posição de que os embriões somáticos podem ter uma origem verdadeiramente multicelular (46, 47). Aqui, um grupo de células vizinhas em estado equivalente de indução embriogénica podem associar-se e actuar conjuntamente na produção do embrião somático (48). Os embriões somáticos, que tipicamente desenvolvem pólos radicular e caulinar, são normalmente descontínuos com o tecido adjacente. Acontece por vezes, em embriões com origem multicelular, que as células equivalentes ao suspensor no embrião zigótico não são aparentes e os embriões podem estar intimamente associados ao tecido maternal.

Embora se reconheça uma elevada semelhança estrutural entre embriões somáticos e zigóticos, os primeiros possuem um desenvolvimento anatómico mais diverso e um padrão de planos de divisão celular menos ordenado que os segundos. Acredita-se que esta diferença resulte da maior heterogeneidade ambiental a que as culturas estão sujeitas, e como as últimas fases do desenvolvimento de embriões somáticos e zigóticos são muito semelhantes, poderá assumir-se que ambos os processos embriogénicos sejam essencialmente idênticos (28). Os estágios da ontogénese dos embriões somáticos em dicotiledóneas encontram-se esquematizados na figura I.1. De um modo geral, distinguem-se 5 estágios ou fases principais:

- **Pró-embriões** - pequenos agregados de células meristemáticas dos quais emergem os embriões somáticos;
- **Estágio globular** - grandes grupos de células que podem visualizar-se mais destacadamente e que ainda não apresentam a forma de embrião;
- **Estágio cordiforme** (ou em forma de coração) – forma trilobada característica onde os primórdios cotiledonares se separam do pólo radicular;
- **Estágio de torpedo** – uma forma mais alongada comparativamente à do estágio anterior; e
- **Plântula** ou **estágio pós-cotiledonar** – onde se consegue discernir a estrutura de uma pequena planta, com os dois pólos meristemáticos e os cotilédones.

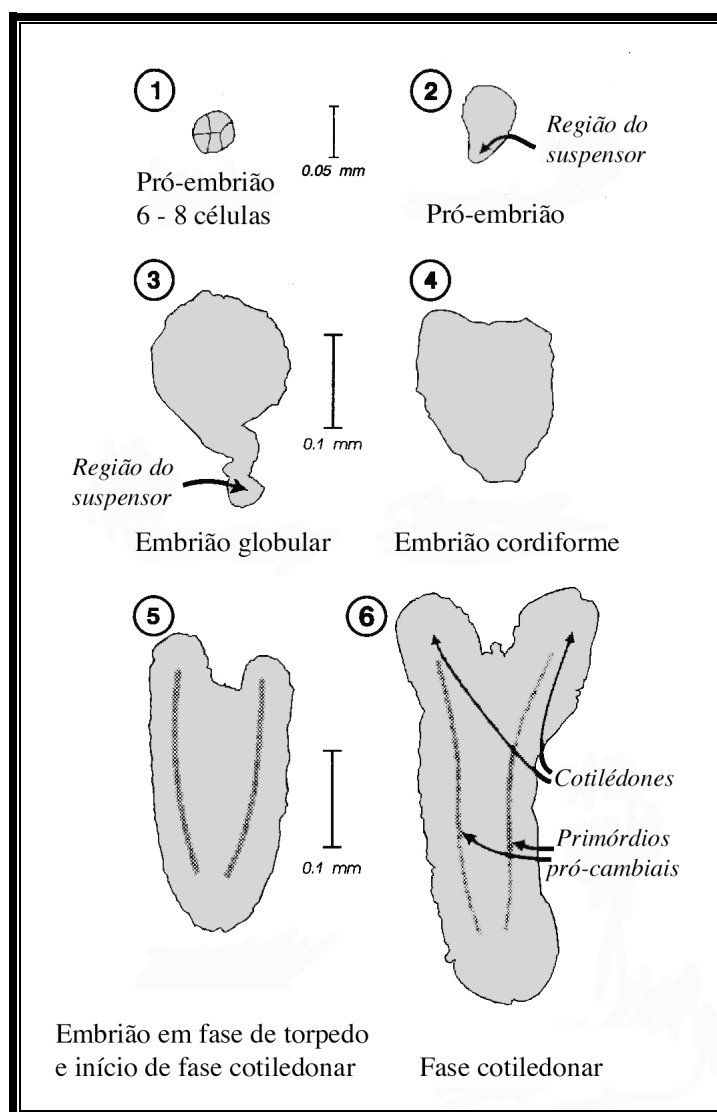


Figura I.1 – Sequência cronológica (1m6) dos principais estágios da embriogênese somática numa dicotiledónea. Adaptado de George 1993 (28).

A título ilustrativo e para complementar os aspectos abordados no texto, os principais métodos para obtenção de culturas *in vitro* e de micropropagação de plantas encontram-se representados na figura I.2.

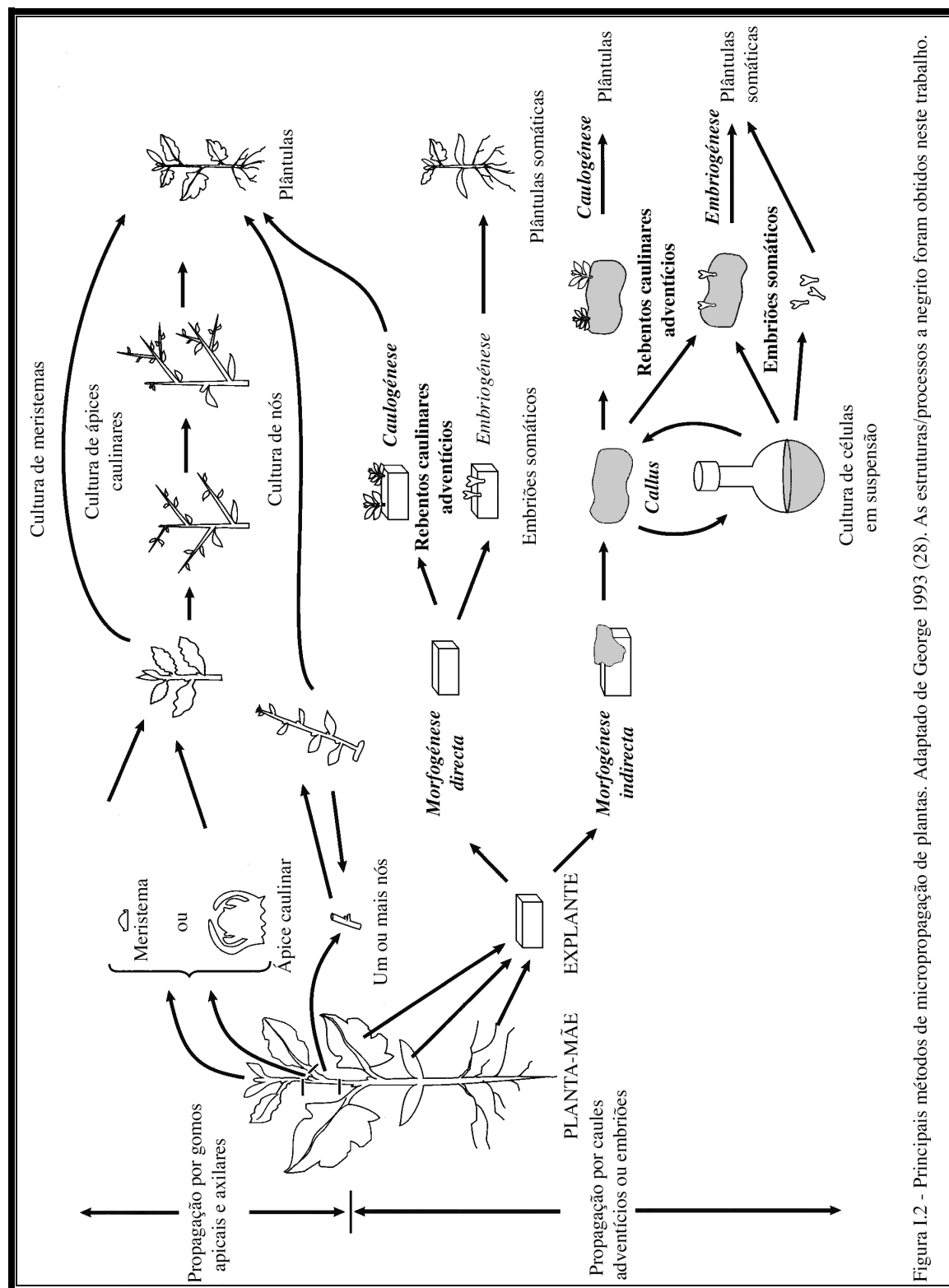


Figura 1.2 - Principais métodos de micropropagação de plantas. Adaptado de George 1993 (28). As estruturas/processos a negrito foram obtidos neste trabalho.



A embriogénese somática começou por ser induzida em relativamente poucas espécies de plantas (49), de forma esporádica e pouco controlada. Porém, cada vez mais registos deste processo têm vindo a surgir à medida que o conhecimento dos **factores** que controlam a indução e expressão deste fenómeno *in vitro* se vem aprofundando. Os principais factores que influenciam a morfogénese *in vitro*, em particular a embriogénese somática, encontram-se relacionados com o “genótipo” ou património genético da planta; com o “ambiente físico-químico” em que as culturas se desenvolvem; ou com “factores dependentes do próprio tecido”, como a idade e o estado fisiológico (28). Relativamente ao segundo grupo, onde se incluem os factores mais facilmente manipuláveis, podem destacar-se: **a composição do meio de cultura**, a temperatura e a intensidade e qualidade da luz. Actualmente, o número de artigos sobre embriogénese somática em plantas é imenso abrangendo espécies pertencentes aos grupos vegetais mais díspares, desde herbáceas a lenhosas, arbustivas ou arbóreas, de gimnospérmicas a angiospérmicas, de espécies nativas de climas temperados a espécies tropicais, fruteiras, gramíneas, leguminosas e, inclusivamente, espécies pertencentes à família Cactacea (consultar 30).

### ***Composição do meio de cultura***

Devido à divisão espacial da biossíntese de metabolitos na planta, sabe-se menos sobre as necessidades nutricionais de órgãos e tecidos individuais do que das da planta inteira (29). Para além da limitada actividade biossintética de tecidos isolados, os sistemas *in vitro* podem apresentar alterações ao seu padrão metabólico normal. Estas alterações no metabolismo das culturas estão geralmente associadas a alterações no meio nutricional externo (29).

A composição dos meios de cultura pode variar de forma quase ilimitada, sendo a formulação mais adequada dependente não só das plantas mas também do tipo de cultura que se pretende iniciar ou processo de diferenciação que se quer induzir. No entanto, na composição de um meio de cultura para tecidos vegetais incluem-se, basicamente, **macronutrientes**, **micronutrientes**, um suplemento de ferro, vitaminas, uma **fonte de carbono** e, geralmente, **reguladores de crescimento vegetal** (29). Apesar da imensa variedade de meios de cultura que têm sido testados, o meio de

Murashige e Skoog (MS) (50) é reconhecido como um meio bastante adequado para o crescimento de *callus* e morfogénese directa e indirecta de muitas espécies (28).

Os “reguladores de crescimento vegetal” ou **fito-reguladores**, são quase invariavelmente componentes obrigatórios dos meios de cultura visto terem um papel fundamental na indução e manutenção da multiplicação celular. As classes de fito-reguladores mais comumente utilizadas são as **auxinas** e as **citocininas**. As primeiras estimulam a expansão celular, sendo frequentemente utilizadas na iniciação e manutenção de crescimento de *calli* e células em suspensão e na estimulação de rizogénese e embriogénese; as citocininas promovem a divisão celular de tecidos em cultura na presença de auxinas, sendo utilizadas para a iniciação de *calli*, proliferação de gomos e inibição da rizogénese (28, 29). Os suplementos auxina-citocinina nos meios de cultura são instrumentais na regulação da divisão, expansão e diferenciação celulares e na morfogénese (29). O crescimento e a morfogénese *in vitro* são ainda altamente dependentes da interacção entre os reguladores endógenos e exógenos, da interacção destas substâncias com o genótipo da planta e ainda com outros componentes do meio de cultura (28).

Com os **macronutrientes** são fornecidos às culturas os elementos essenciais N, K, **Ca**, P, Mg e S (para além do C, O e H) e com os **micronutrientes**, os elementos Fe, Cl, Mn, Zn, B, Cu, Mo e, nalguns casos, Na e Ni, traduzindo o prefixo macro- e micro-, a quantidade relativa que é absorvida pelas plantas a partir do solo. Para além destes elementos inorgânicos essenciais, os meios de cultura deverão ainda conter um **hidrato de carbono (CHO)** para fornecer potencial redutor e substituir o carbono que em condições *in vivo* é fixado pelas plantas (28, 29). Um dos passos fundamentais na formulação/optimização dum meio para cultura de tecidos vegetais é a selecção/modificação dos macronutrientes numa concentração e equilíbrio correctos (28). Devido à vasta gama de componentes do meio, e respectivas interacções, relevantes para a culturas de tecidos, focar-se-ão apenas os que foram objecto de estudo neste trabalho.

- O azoto (**N**) é vital para as plantas, sendo absorvido pelas células vegetais principalmente na forma de ião amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) e ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). O crescimento de tecidos e a morfogénese *in vitro* são marcadamente influenciados pela disponibilidade de N e pela forma em que este é adicionado ao meio de cultura, pelo

que a maior parte dos meios de cultura contêm sais inorgânicos de ambas as formas iónicas. A absorção destes iões pelas culturas é muito dependente do pH do meio, sendo o nitrato apenas eficientemente absorvido sob condições de pH ácido e o amónio em condições de pH mais fisiológicas. Nas células, o nitrato é reduzido a amónio através das enzimas nitrato e nitrito reductase, com consumo de energia, sendo o ião amónio posteriormente incorporado em aminoácidos e outros compostos azotados (fig. I.3). A inter-relação entre o metabolismo do N e do C (fig. I.3) e a interferência dos açúcares adicionados ao meio na absorção do N, explicam o facto do crescimento das culturas e a morfogénese estarem dependentes não só da razão N/C como ainda do tipo e concentração de açúcar (28).

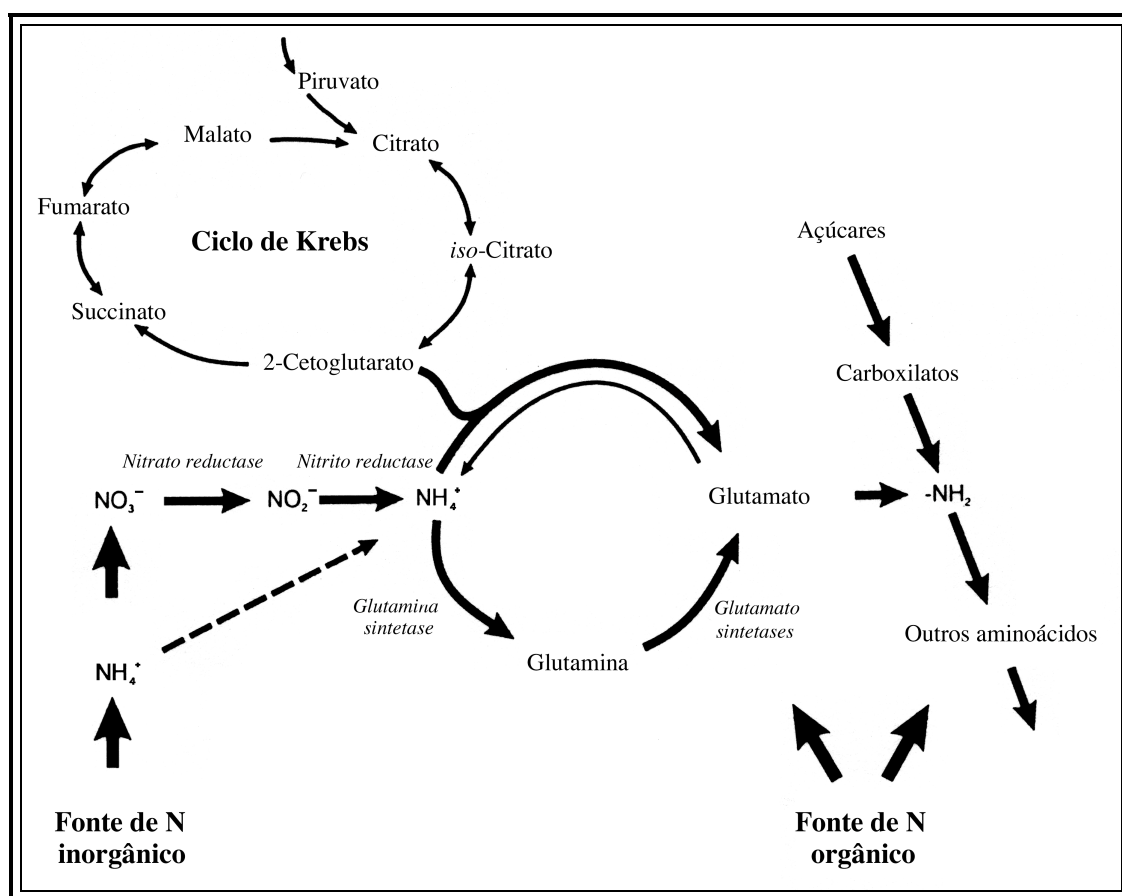


Figura I.3 – O metabolismo dos iões nitrato e amónio nas células. Adaptado de George 1993 (28).

- Nas plantas, o cálcio (**Ca**) tem uma multiplicidade de funções. Sendo um dos principais catiões, o  $\text{Ca}^{2+}$  ajuda a manter o equilíbrio eléctrico; devido à sua capacidade para ligar moléculas biológicas entre si, está envolvido nas propriedades estruturais e fisiológicas das membranas e paredes celulares; é cofactor de algumas enzimas hidrolíticas e essencial para a actividade de algumas sintetases e; devido à manutenção activa de concentrações citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  em valores sub-micromolares, este ião pode ter um papel na regulação de mecanismos celulares e ser utilizado como mensageiro secundário. O  $\text{Ca}^{2+}$  está ainda envolvido em fenómenos de morfogénese *in vitro* sendo ainda necessário para muitas das respostas induzidas por fito-reguladores, particularmente auxinas e citocininas (28).
- A grande maioria das culturas de tecidos induzidas *in vitro* não são autotróficas necessitando, portanto, de **hidratos de carbono** exógenos para obtenção de carbono e energia. A sacarose e a glucose são os hidratos de carbono mais universalmente utilizados em cultura de tecidos, sendo geralmente adicionadas nas concentrações de 2 a 3 % (p/v) (29). Porém, hidratos de carbono alternativos têm já sido utilizados com melhores resultados. Os principais açúcares que podem ser utilizados pelas plantas são as hexoses **glucose**, **frutose**, galactose e manose; as pentoses arabinose, ribose e xilose; os dissacarídeos **sacarose**, **maltose**, celobiose e trealose; e o trissacarídeo rafinose. De valor nutricional elevado são apenas a glucose, a frutose, a sacarose, a maltose e a rafinose (28). A variabilidade de respostas aos diferentes açúcares na indução de diferentes tipos de cultura é muito elevada. Depende não só do tipo de cultura em questão (por exemplo, nas culturas de órgãos, a sacarose é geralmente preferida visto ser um açúcar translocável), como depende da capacidade das diferentes espécies utilizarem os açúcares menos comuns.

### *Micropropagação e culturas in vitro de linho*

A importância do estabelecimento de culturas *in vitro* de uma espécie vegetal prende-se com um vastíssimo número de questões e objectivos. Para além do aspecto da micropropagação de génotipos de interesse, os diferentes sistemas em cultura podem, não só, veicular a produção de determinados compostos, como constituir modelos experimentais para estudos de carácter mais aplicado ou mais fundamental.

Apesar das primeiras referências a fenómenos de morfogénese *in vitro* em *Linum usitatissimum* L. datarem da primeira metade do séc. XX (51, 52, 53), constata-se que estudos sistemáticos de morfogénese nesta espécie, incluindo o estabelecimento de diferentes tipos de culturas *in vitro*, são relativamente escassos. Citando alguns exemplos, só na década de 70-80 foram realizados alguns estudos sobre os efeitos de fito-reguladores na indução de culturas de *calli* e na morfogénese *in vitro* de linho a partir de cotilédones (54, 55), de segmentos de hipocótilos (56, 57), de ambos os tecidos (58); de meristemas apicais (59); de raízes (60); e a partir de protoplastos (56, 61, 62). As possibilidades de regeneração de plantas a partir de protoplastos foram também estudadas em várias espécies selvagens do género *Linum* (62, 63). Alguns trabalhos realizados com culturas *in vitro* de linho visaram objectivos que não o estudo do controlo da morfogénese. Para referir alguns desses objectivos, podem destacar-se os seguintes: obtenção de linhas celulares tolerantes a determinados componentes do meio (64); obtenção de plantas transgénicas por transformação com *Agrobacterium* (6, 65, 66, 67, 68) ou através do bombardeamento dos tecidos com partículas de ouro (69); estudo da variação somaclonal (70, 71) ou variação genómica do linho (72); ou estudos sobre componentes estruturais e enzimáticos da parede celular (73, 74, 75, 76, 77, 78). Segundo Pretová (79), os meios de propagação vegetativa do linho são limitados. Consequentemente, o processo de regeneração de plantas *in vitro* por embriogénese somática pode ser importante não só para obviar os constrangimentos associados à cultura do linho como para a micropropagação de híbridos ou genótipos seleccionados de elevado valor acrescentado, tais como os que produzem óleo de linhaça com baixo teor de ácido linolénico (79). A embriogénese somática de *Linum usitatissimum* L. foi pela primeira descrita por Pretová e Williams (57), que induziram a produção de embrióides directamente a partir de segmentos de hipocótilo. Recentemente, Tejavathi *et al.* (80) publicaram um artigo sobre embriogénese somática indirecta de linho a partir de segmentos de hipocótilo inoculados em meio MS suplementado com auxina.

Às evidências empíricas, que se vão somando com os estudos *in vitro*, não está ainda associada uma causa directa para o aparecimento dos embriões somáticos. Mesmo em condições controladas, a diversidade de tratamentos diferentes capazes de induzir embriogénese somática sugere que não há um único estímulo que induza a competência embriogénica numa célula não pré-determinada. Tal como acontece com a apomixia,

que pode ser induzida por vários factores, tais como, fotoperíodo, temperatura, nutrientes e sais inorgânicos (34), diferentes factores poderão também contribuir para a indução de embriogénese somática *in vitro*. Daqui resulta que numa estratégia de estabelecimento de culturas *in vitro* e protocolos de embriogénese somática para o linho, se reveste de enorme importância a manipulação das condições de cultura.

A abordagem empírica pode igualmente fornecer pistas no sentido de conhecer os processos associados à embriogénese somática, nomeadamente os de natureza metabólica, pelo que o estudo da variação ontogénica de compostos associada a um processo embriogénico bem estabelecido *in vitro* poderá dar um contributo considerável na racionalização do fenómeno.

#### *Estudo da variação da composição lipídica em culturas in vitro de linho*

Apesar de vários sistemas embriogénicos estarem bem caracterizados do ponto de vista histológico e morfológico, ao nível bioquímico e molecular, a indução e o desenvolvimento de embriões não está ainda esclarecida. Segundo Fujimura e Komamine (81), a diferentes estágios do desenvolvimento de embriões somáticos correspondem taxas de divisão celular distintas, ocorrendo um aumento muito pronunciado das mesmas, entre o estágio de pró-embrião e o de embrião globular. Nalguns casos, o início da embriogénese (somática ou zigótica) está ligado a uma alteração nas isoenzimas (82). Alguns autores verificaram ainda que embriões somáticos contêm proteínas que não se encontram noutros tecidos (83) porém, a variação na população de proteínas durante a embriogénese parece ser, na realidade, pequena (84).

Na tentativa de estudar as variações ocorridas ao nível génico durante a embriogénese somática, diferentes tipos de abordagem de biologia molecular têm sido ensaiados em várias espécies. No entanto, até agora, apenas alguns genes foram descritos como sendo expressos durante os estágios precoces (preglobulares) do desenvolvimento de embriões somáticos (85) e, na maioria dos casos em que se isolaram genes relacionados com a embriogénese, a função das proteínas codificadas era desconhecida (86). O estudo do perfil de variação de constituintes lipídicos, de função conhecida, ao longo do processo

embriogénico, poderá dar indicações que ajudem a interpretar a função de alguns daqueles genes.

Estudos sobre a variação de lípidos durante o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos *in vitro* têm sido realizados (87, 88, 89, 90, 91). Existem também alguns estudos comparativos em culturas de *calli* e células em suspensão relativamente a alguns compostos lipídicos (87, 92, 93, 94, 95, 96, 97). Porém, o estudo da variação ontogénica de compostos específicos associada à indução e expressão de embriogénese somática, surge mais esporadicamente na literatura (98, 99, 100, 101, 102, 103). De um modo geral, reconhece-se que a variação da componente lipídica durante o processo de embriogénese somática, induzida directa ou indirectamente, obedece a um padrão genérico que consiste, basicamente, num aumento transiente de reservas (proteínas, amido, mas mais geralmente TAG), que antecede e culmina com o aparecimento dos embriões somáticos, seguindo-se uma diminuição das mesmas com o desenvolvimento subsequente dos embriões. Relativamente a *Linum usitatissimum* existem estudos comparativos sobre a variação lipídica durante o desenvolvimento de embriões zigóticos *in vivo* e *in vitro* (79); bem como estudos sobre biossíntese de constituintes lipídicos, designadamente de ácidos gordos polinsaturados (18), e de linolenato, quer durante o desenvolvimento de embriões zigóticos *in vivo* (88, 104), quer em extractos celulares *in vitro* (88); e estudos sobre a síntese de lípidos *in vitro* em membranas microssomais (105) ou em plastídeos de cotilédones (106).

### *Culturas in vitro: melhoramento e produção de metabolitos*

A maior parte do óleo de origem vegetal produzido correntemente é usado na alimentação, embora utilizações industriais não alimentares sejam igualmente feitas a partir de lípidos extraídos de plantas. Aproximadamente 20 % das calorias consumidas nos países desenvolvidos deriva de óleos vegetais (principalmente óleo de soja), pelo que o melhoramento da quantidade e qualidade dos óleos é um dos principais objectivos dos melhoradores genéticos de plantas (107). Acredita-se que a composição em ácidos gordos dos óleos da nossa dieta alimentar, em particular os ácidos gordos saturados, influencie a etiologia de doenças importantes como a aterosclerose (e complicações cardíacas associadas) e o cancro. Várias tentativas têm já sido feitas no sentido de

alterar a composição em ácidos gordos destes óleos, reduzindo as proporções de 16:0, 18:0 e de 18:2 e 18:3 em favor de 18:1 (107). A importância da redução dos ácidos polinsaturados prende-se com a instabilidade térmica destes compostos, problema que se coloca na produção de óleos de fritar.

Paralelamente ao melhoramento clássico, há um crescente interesse na produção de metabolitos específicos através do uso de técnicas de cultura *in vitro* de tecidos vegetais (108). A utilização de tais técnicas não só elimina as restrições edafo-climáticas e sazonais a que as culturas estão sujeitas *in situ* (109), como por vezes é necessária na manipulação biotecnológica da produção de compostos naturais, difíceis de obter por síntese química. Segundo alguns autores (107), o recurso à engenharia metabólica de lípidos permitiria, não só, ampliar as possibilidades de melhoramento genético das plantas para a produção de óleos de qualidade alimentar, como também, a produção em larga escala de (novos) metabolitos em culturas de tecidos e células vegetais.

A embriogénese somática é um processo de regeneração de plantas de enorme importância prática devido à sua eficiência na clonagem, em estudos do desenvolvimento vegetal, manipulação genética e produção de sementes sintéticas (109). Para além de constituir um recurso tecnológico valiosíssimo para perpetuar genótipos de elite ou variedades recalcitrantes por técnicas convencionais, pode ser fundamental para perpetuar genótipos transformados no sentido da produção de metabolitos específicos. A transformação génica de *Linum usitatissimum* foi já obtida por várias metodologias, incluindo infecção com *Agrobacterium tumefaciens* (6, 65) ou com *A. rhizogenes* (60, 67), e bombardeamento de partículas (69), pelo que a possibilidade de engenharia molecular metabólica é tecnicamente possível.

De um modo geral, os embriões somáticos têm um padrão de biossíntese e acumulação de lípidos semelhante ao dos embriões zigóticos (90). Quanto a *calli* e células em suspensão porém, pouco se conhece da biossíntese de lípidos e interacção entre composição lipídica e parâmetros do meio de cultura. Um trabalho recente (109), onde foi utilizado o modelo de embriogénese somática a partir de hipocótilos de *Brassica juncea*, descreve um procedimento de manipulação do meio de cultura no sentido de aumentar a acumulação de compostos lipídicos.



### *Objectivos gerais*

Tendo em conta a elevada importância sócio-económica que *Linum usitatissimum* continua a ter, nacional e internacionalmente e, considerando os trabalhos de investigação acabados de referir, entendeu-se que haveria espaço e se justificavam novos estudos sobre a espécie que, simultaneamente, ampliassem as perspectivas no domínio tecnológico e o conhecimento de aspectos fundamentais do desenvolvimento de culturas *in vitro* desta espécie.

Neste contexto foram estabelecidos como objectivos gerais:

- a elaboração e optimização de **protocolos de micropropagação** de linho com particular incidência na **embriogénese somática**, e
- a determinação dos **perfis de variação de compostos de natureza lipídica** associados ao **crecimento** de tecidos indiferenciados e à indução e desenvolvimento da **embriogénese somática**.

## Bibliografia

- 1 **Singh** S.P., Pandey N.D., Srivastava J.L. e Singh S.V. (1984) Insecticidal trial against linseed gall midge, *Dasyneura lini* Barnes. Indian Journal of Entomology 46, 114-115.
- 2 **Berkenkamp** B. e Kirkham C. (1990) Flax diseases In the N.E. Saskatchewan, 1989. Canadian Plant Disease Survey 70(1), 75.
- 3 **Basandrai** D., Basandrai A., Sethi G.S. e Bhateria S. (1994) Evaluation of flax (*Linum usitatissimum*) genotypes for multiple-disease resistance. Indian Journal of Agricultural Sciences 64(10), 704-707.
- 4 **Spielmeyer** W., Green A.G., Bittisnich D., Mendham N. e Lagudah E.S. (1998) Identification of quantitative trait loci contributing to fusarium wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*). Theoretical and Applied Genetics 97(4), 633-641.
- 5 **Davies** D.H. (1987) Evaluation of sulfonyl-urea herbicides for use in flax and linseed in south-east Scotland. Proceedings of the British Crop Protection Conference-Weeds 3, 821-827.
- 6 **McHughen** A. (1989) Agrobacterium mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. Plant Cell Reports 8(8), 445-449.
- 7 **Menoux** Y. (1986) Frost resistance criteria for flax. Agronomie: Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement 6(9), 789-796.
- 8 **Younis** M.E., Hasaneen M.N. e Nemet-Alla M.M. (1987) Plant growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. IV. Effects of salinity on certain factors associated with the germination of three different seeds high in fats. Annals of Botany 60(3), 337-344.
- 9 **Singh** S.P. (1984) Variability in linseed under rainfed condition. The Madras Agricultural Journal 71(4), 255-256.
- 10 **Gusta** L.V., OConnor B.J. e Bhatta R.S. (1997) Flax (*Linum usitatissimum* L.) responses to chilling and heat stress on flowering and seed yield. Canadian Journal of Plant Science 77(1), 97-99.
- 11 **Mukherjee** A.K., Rana S.K., Roquib M.A. e Sounda S. (1987) Effect of different doses of nitrogen and phosphorus on linseed production. Environment & Ecology 5(3), 604-605.
- 12 **Hocking** P.J., Randall P.J. e Pinkerton A. (1987) Mineral nutrition of linseed and fiber flax.

- Advances in Agronomy 41, 221-296.
- 13 **Melita** V.S. e Tewari C.P. (1981) Effect of levels of irrigation, nitrogen and phosphorus on yield of linseed. *Journal of Agricultural and Scientific Research* 23, 24-28.
  - 14 **Singh** R.P., Singh B.P. e Dhindsa K.S (1979) Effect of varying doses of N, P, K (nitrogen, phosphorus, potassium) on the seed and oil yield of linseed (*Linum usitatissimum* Linn.). *Current Agriculture* 3, 189-191.
  - 15 **Nichterlein** K., Marquard R. e Friedt W. (1988) Breeding for modified fatty acid composition by induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Breeding* 101(3), 190-199.
  - 16 **Tonnet** M.L. e Green A.G. (1987) Characterization of the seed and leaf lipids of high and low linolenic acid flax genotypes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 252 (2), 646-654.
  - 17 **Green** A.G. e Marshall D.R. (1981) Variation for oil quantity and quality in linseed (*Linum usitatissimum*). *Australian Journal of Agricultural Research* 32, 599-607.
  - 18 **Green** A.G. (1986) Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed oil. *Theoretical and Applied Genetics* 72(5), 654-661.
  - 19 **Green** A.G. (1986) A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. *Canadian Journal of Plant Science* 66, 499-503.
  - 20 **Bielinski** K., Skarzynski L. e Pakulska E. (1982) Field beans, peas, sweet lupin and extracted linseed and rapeseed oil as a source of protein for geese. *Polish Journal of Animal Science and Technology* 9(1), 247-262.
  - 21 **Deshmukh** S.V., Netke S.P. e Dabadghao A.K. (1982) Studies on maximizing the utilization of linseed-cake by starter chicks. *The Indian Journal of Animal Sciences* 52(4), 241-245.
  - 22 **Hubbard** N.E., Chapkin R.S. e Erickson K.L. (1994) Effect of dietary linseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production in murine macrophages. *Lipids* 29(9), 651-655.
  - 23 **Lith** H.A., Herman S., Zhang X., Palen J.G., Zutphen L.F. e Beynen A.C. (1990) Influence of dietary fats on butyrylcholinesterase and esterase-1 (ES-1) activity in plasma rats. *Lipids* 25(12), 779-786.
  - 24 **Fritsche** K.L. e Johnston P.V. (1990) Effect of dietary omega-3 fatty acids on cell-mediated cytotoxic activity in BALB7C mice. *Nutrition Research* 10(5), 577-588.
  - 25 **Green** A.G. e Marshall D.R. (1984) Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. *Euphytica* 33, 321-328.
  - 26 **Green** A.G. (1986) Effect of temperature during seed maturation on the oil composition of

- low-linolenic genotypes of flax. *Crop Science* 26, 961-965.
- 27 <http://www.fao.org/regional/europe/escorena/fla-crop.html>
- 28 **George E.F.**, Plant Propagation by Tissue Culture, Part I: The Technology, Exegetics Limited, Edington, England, 1993, pp. 574.
- 29 **Dodds J. e Roberts L.W.**, Experiments In Plant Tissue Culture, 3<sup>rd</sup> Edition, Cambridge University Press, 1995, pp. 256.
- 30 **George E.F.**, Plant Propagation by Tissue Culture, Part II: In Practice, Exegetics Limited, Edington, England, 1996, pp. 1361.
- 31 **Lindsey K. e Jones M.G.K.**, Plant Biothecnology In Agriculture, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Syngapore, 1989, pp. 241.
- 32 **Bigot C., Ohki S. e Mousseau J.** (1977) Experimental data for a strategy for the improvement of the shoot forming capacity *in vitro*. *Acta Hort.* 78, 125-132.
- 33 **Christianson M.L.**, Causal effects in morphogenesis. *In*: C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer (Eds.) *Plant Tissue and Cell Culture*, Alan R. Liss Inc., New York, 1987, pp 45-55.
- 34 **Mordhorst A.P., Toonen M.A. e De Vries S.C.** (1997) Plant embryogenesis. *Critical Reviews In Plant Science* 16(6), 535-576.
- 35 **Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S. e Maraffa S.B.** (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews* 2, 268-310.
- 36 **Evans D.A., Sharp W.R. e Flick C.**, Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. *In*: T.A. Thorpe (Ed.) *Plant Tissue Culture. Methods and Applications In Agriculture*, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, 1981, pp. 45-113.
- 37 **Sharp W.R. e Evans D.A.**, Application of somatic embryogenesis to crop improvement. *In*: A. Fujiwara (Ed.) *Plant Tissue Culture, Proc. 5<sup>th</sup> Int. Cong. Plant Tissue and Culture*, Tokyo, Japan, 1982, pp. 759-762.
- 38 **McWilliam A.A., Smith S.M. e Street H.E.** (1974) The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Annals of Botany* 38, 243-250.
- 39 **Nomura K. e Komamine A.** (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryops at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology* 79, 988-991.
- 40 **Konar R.N., Thomas E. e Street S.E.** (1972) Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus scleratus* L. *Journal of Cell Science* 11, 77-93.
- 41 **Vasil V. e Vasil I.K.** (1982) The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos. *Botanical Gazette* 143, 454-465.
- 42 **Nomura K. e Komamine A.** (1986) Polarized DNA synthesis and cell division in cell

- clusters during somatic embryogenesis from single carrot cells. *New Phytologist* 104, 25-32.
- 43 **Mehra** P.N. e Jaidka K. (1985) Experimental induction of embryogenesis in pear. *Phytomorphology* 35, 1-10.
- 44 **Jones** T.J. e Rost T.L. (1989) The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Botanical Gazette* 150, 41-49.
- 45 **Hepher** A., Boulter M.E., Harris N. e Nelson R.S. (1988) Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.). *Annals of Botany* 62, 513-519.
- 46 **Maheswaran** G. e Williams E.G. (1985) Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. *Annals of Botany* 56, 619-630.
- 47 **Wernicke** W., Potrykus I. e Thomas E. (1982) Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* – the morphogenic pathways. *Protoplasma* 11, 53-62.
- 48 **Williams** E.G. e Maheswaran G. (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57, 443-462.
- 49 **Tisserat** B., Esan E.B. e Murashige T. (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews* 1, 1-78.
- 50 **Murashige** T. e Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- 51 **Burns** G.P. e Hedden M.E. (1906) Beihefte zum Bot. Centralbl. 19, 383. Citado no Mathews H.V. e Narayanaswamy S. 1976 (58).
- 52 **Crooks** D.M. (1933) *Botanical Gazette* 95, 209. Citado no Mathews H.V. e Narayanaswamy S. 1976 (58).
- 53 **Link** G.K. e Eggers V. (1946) Mode, site, and time of initiation of hypocotyledonary bud primordia in *Linum usitatissimum* L. *Botanical Gazette* 107, 441-454.
- 54 **Ibrahim** R.K. (1971) *Canadian Journal of Botany* 49, 295-298. Citado no Rybczynski J.J. (1975) (55).
- 55 **Rybczynski** J.J. (1975) Callus formation and organogenesis of mature cotyledons of *Linum usitatissimum* L. var. Szokijiskij *in vitro* culture. *Genetica Polonica* 16(2), 161-172.
- 56 **Gamborg** O.L. e Shyluk J.P. (1976) Tissue culture, protoplasts and morphogenesis in flax. *Botanical Gazette* 137, 301-306.
- 57 **Pretová** A. e Williams E.G. (1986) Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Plant Physiology* 126, 155-161.

- 
- 58 **Mathews** H.V. e Narayanaswamy S. (1976) Phytohormone control of regeneration in cultured tissues of flax. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 80, 436-442.
- 59 **Lane** D.W. (1979) Influence of growth regulators on root and shoot initiation from flax meristem-tips and hypocotyls *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 45, 260-264.
- 60 **Zhan** X.C., Jones D.A. e Kerr A. (1989) Regeneration of shoots on root explants of flax. *Annals of Botany* 63(2), 297-299.
- 61 **Barakat** N.M. e Cocking E.C. (1983) Plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Linum usitatissimum* L. (flax). *Plant Cell Reports* 2, 314-317.
- 62 **Ling** H.Q. e Binding H. (1987) Plant regeneration from protoplasts in *Linum*. *Plant Breeding* 98, 312-317.
- 63 **Barakat** M.N. e Cocking E.C. (1985) An assessment of the cultural capabilities of protoplasts of some wild species of *Linum*. *Plant Cell Reports* 4, 164-167.
- 64 **McHughen** A. e Swartz M. (1984) A tissue-culture derived salt-tolerant line of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Plant Physiology* 177, 109-117.
- 65 **Dong** J.Z. e McHughen A. (1993) An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 88, 61-71.
- 66 **Jordan** M.C. e McHughen A. (1988) Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Reports* 7, 281-284.
- 67 **Zhan** X.C., Jones D.A. e Kerr A. (1988) Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology* 11(5), 551-559.
- 68 **Basiran** N., Armitage P., Scott R.J. e Draper J. (1987) Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*: regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Reports* 6(5), 396-399.
- 69 **Wijayanto** T. e McHughen A. (1999) Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 35, 456-465.
- 70 **Cullis** C.A. e Cleary W. (1986) DNA variation in flax tissue culture. *Canadian Journal of Genetic Cytology* 28, 247-251.
- 71 **Marshall** G. e Courduries P. (1992) An assessment of somaclonal variation linseed (*Linum usitatissimum*). *Annals of Applied Biology* 120, 501-509.
- 72 **Cullis** C.A., Swami S. e Song Y.G. (1999) RAPD polymorphisms detected among the flax genotrophs. *Plant Molecular Biology* 41(6), 795-800.
- 73 **Goubet** F. e Morvan C. (1994) Synthesis of cell wall galactans from flax (*Linum usitatissimum* L.) suspension-cultured cells. *Plant and Cell Physiology* 35(5), 719-727.
- 74 **Rihouey** C., Jauneau A., Cabinflaman A., Demarty M., Lefebvre F. e Morvan C. (1995) Calcium and acidic pectin distribution in flax cell walls: Evidence for different kinds of

- linkages in the cell junction and middle lamella of the cortical parenchyma of flax hypocotyl. *Plant Physiology and Biochemistry* 33(4), 509-517.
- 75 **Mareck A.**, Gaffe J., Morvan O., Alexandre C. e Morvan C. (1995) Characterization of isoforms of pectin methylesterase of *Linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. *Plant and Cell Physiology* 36(3), 409-417.
- 76 **Mcdougall G.J.** e Morrison I.M. (1995) Partial purification of peroxidase isozymes with altered substrate specificity from flax stem cell walls. *Journal of Plant Physiology* 146(4), 393-397.
- 77 **Gorshkova T.A.**, Wyatt S.E., Salnikov V.V., Gibeaut D.M., Ibragimov M.R., Lozovaya V.V. e Carpita N.C. (1996) Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110(3), 721-729.
- 78 **Gorshkova T.A.**, Chemikosova S.B., Lozovaya V.V. e Carpita N.C. (1997) Turnover of galactans and other cell-wall polysaccharides during development of flax plants. *Plant Physiology* 114(2), 723-729.
- 79 **Pretová A.**, Flax (*Linum usitatissimum* L.): embryo culture studies. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology In Agriculture and Forestry*, Vol. 10 Legumes and Oilseed Crops I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990, pp. 515-537.
- 80 **Tejavathi D.H.**, Sita G.L. e Sunita A.T. (2000) Somatic embryogenesis in flax. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63, 155-159.
- 81 **Fujimura T.** e Komamine A. (1980) The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Phytologist* 86, 213-218.
- 82 **Everett N.P.**, Wach M.J. e Ashworth D.J. (1985) Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Science* 41, 133-140.
- 83 **Hahne G.**, Mayer J.E. e Lorz H. (1988) Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass *Dactylis glomerata* L. *Plant Science* 55, 267-279.
- 84 **Sung Z.R.**, Smith J.M., Choi J.H., Krauss M., Borkird C. e Liu L.S. (1988) Gene expression in embryogenesis. *HortScience* 23, 513-515.
- 85 **Sterk P.**, Booiij H., Schellekens G.A., Kammen A.V. e De Vries S.C. (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell* 3, 907-921.
- 86 **Wurtele E.S.**, Wang H., Durgerian S., Nikolau B.J. e Ulrich T.H. (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiology* 102, 303-312.
- 87 **Weselake R.** (2000) Lipid biosynthesis in cultures of oilseed rape. *In Vitro Plant Cellular and Developmental Biology* 36, 338-348.
- 88 **Stymne S.**, Tonnet M.L. e Green A.G. (1992) Biosynthesis of linolenate in developing

- embryos and cell-free preparations of high-linolenate Inseed (*Linum usitatissimum*) and low-linolenate mutants. Archives of Biochemistry and Biophysics 294 (2), 557-563.
- 89 **Yoshida H.** (1984) Molecular species and fatty acid distributions of triacylglycerols from germinating soybean cotyledons. Lipids 19(12) 936-941.
- 90 **Avjioglu A e Knox R.B.** (1989) Storage lipid accumulation by zygotic and somatic embryos in culture. Annals of Botany 6-3, 409-420.
- 91 **Hakman I.** (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. Physiologia Plantarum 87, 148-159.
- 92 **Schmitt P. Gaspar T. e Hagege D.** (1994) Sterol composition of normal and habituated sugarbeet callus (*Beta vulgaris* L. *Altissima*). In Vitro Plant Cellular and Developmental Biology 30, 1-3.
- 93 **Carriere F., Chagvardieff P., Gil G., Pean M., Sigoillot J.C. e Tapie P.** (1990) Paraffinic hydrocarbons in heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. Plant Science 71, 93-98.
- 94 **Williams M., Francis D., Hann A.C. e Harwood J.L.** (1991) Changes in lipid composition during callus differentiation in cultures of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Journal of Experimental Botany 42 (245), 1551-1556.
- 95 **Husemann W., Radwan S.S., Mangold H.K. e Barz W.** (1980) The lipids in photoautotrophic and heterotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. Planta 147, 379-383.
- 96 **Halder T. e Gadgil V.N.** (1984) Fatty acid in callus cultures: stage of reversal in the proportion of unsaturated to saturated acids and of change in major components. Phytochemistry 23, 47-49.
- 97 **Reidiboym-Talleux L. e March G.G.** (1999) Lipid and fatty acid composition in non-embryogenic calli and embryogenic tissues in wild cherry (*Prunus avium*). Physiology Plantarum 105, 513-520.
- 98 **Hara S., Falk H. e Kleinig H.** (1985) Starch and triacylglycerol metabolism related to somatic embryogenesis in *Papaver orientale* tissue cultures. Planta 164, 303-307.
- 99 **Warren G.S. e Fowler M.W.** (1979) Changing fatty acid composition during somatic embryogenesis in cultures of *Daucus carota*. Planta 144, 451-454.
- 100 **Choi Y.E., Yang D.C., Kim H.S. e Choi K.T.** (1997) Distribution and changes of reserve materials in cotyledon cells of *Panax ginseng* related to direct somatic embryogenesis and germination. Plant Cell Reports 16, 841-846.
- 101 **Turnham E. e Northcote D.H.** (1984) The incorporation of [1-<sup>14</sup>C]acetate into lipids



- during embryogenesis in oil palm tissue cultures. *Phytochemistry* 23, (1) 35-39.
- 102 **Schuchmann** R. e Wellmann E. (1983) Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism. *Plant Cell Reports* 2, 88-91.
- 103 **Mhaske** V.B. e Hazra S. (1994) Appearance of storage lipid (triglycerides) in somatic embryos of peanut (*Arachis hypogaea* L.). In *Vitro Plant Cellular and Developmental Biology* 30P, 113-116.
- 104 **Stymne** S., Green A.G. e Tonnet M.L., Lipid synthesis in developing cotyledons of linolenic acid deficient mutants of linseed. In: P.A. Biacs, K. Gruiz, T. Kremmer (Eds.) *Biological Role of Plant Lipids*, Akadémiai Kiadó, Budapest and Plenum Publishing Corporation, New York. London, 1989, pp. 147-150.
- 105 **Stymne** S. e Stobart A.K. (1985) Oil synthesis in vitro in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta* 164, 101-104.
- 106 **Browse** J. e Slack C.R. (1985) Fatty-acid synthesis in plastids from maturing safflower and linseed cotyledons. *Planta* 166, 74-80.
- 107 **Somerville** C., Browse J., Jaworski J. e Ohlrogge J., Lipids. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000, pp. 507-512.
- 108 **Fu** T.J., Singh G. e Curtis W.R. (Eds) *Plant Cell Culture for Production of Food Ingredients*. Kluwer Academic/Plenum Publishing, New York, 1999.
- 109 **Kumari** A., Cheema G.S. e Munshi S.K. (2000) A hypocotyl-derived somatic embryogenic system in *Brassica juncea* Czern & Cross and its manipulation for enhanced storage lipid accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63, 109-120.

# II

---

## *Cultura In Vitro de Linho (Linum usitatissimum L.): Estabelecimento de Culturas de Calli, Organogénese e Embriogénese Somática.*

Efeito do tipo e idade do explante e de reguladores de crescimento.

*Este capítulo foi adaptado e actualizado com base no artigo:*

“Somatic Embryogenesis, Organogenesis and *Callus* Growth Kinetics of Flax”  
Cunha A. e Fernandes-Ferreira M. (1996) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47, 1-8.

## Resumo

Este trabalho teve como principal objectivo o estabelecimento de culturas *in vitro* de linho, tendo-se estudado as condições experimentais adequadas para a definição de protocolos de micropropagação em meio MS. A capacidade morfogénica e de formação de *callus* (calogénese) foi testada a partir de diferentes tipos de explante primário. Os efeitos de reguladores de crescimento (fito-reguladores) na indução, crescimento e qualidade do *callus* e na morfogénese (organogénese e embriogénese somática) foram estudados a partir de segmentos de hipocótilo de plântulas de linho. A raiz e a parte aérea de plântulas desenvolvidas *in vitro* constituíram um material adequado para a produção de *calli*. Porém, os *calli* induzidos a partir de segmentos de raízes primárias não apresentaram capacidade morfogénica. Nas condições experimentais testadas, a combinação hormonal de 0,5 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + 0,25 mg/l de zeatina (ZEA) foi a mais eficiente na indução e crescimento de *calli*. Os *calli* produzidos eram relativamente compactos, clorofilinos mas sem capacidade rizogénica. Em contraste, a combinação ácido 3-indol-butírico (IBA) + cinetina (KIN) em concentrações semelhantes, induziram *calli* esbranquiçados a ligeiramente clorofilinos, friáveis e com elevada capacidade rizogénica (60 %). Uma experiência factorial incompleta com diferentes combinações de 2,4-D, ZEA e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a vários níveis, mostrou que, a calogénese bem como as diferentes vias de diferenciação – organogénese (rizogénese e caulogénese) e embriogénese somática – induzidas nos explantes eram determinadas por interacções específicas de fito-reguladores/concentrações no meio MS. Os resultados desta experiência factorial revelaram que a via morfogénica pode ser manipulada em explantes de linho fazendo variar a concentração de 2,4-D de 0,05 a 3,2 mg/l. A indução e o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de explantes hipocotiledonares de linho foi possível em meio MS suplementado com 2,4-D e ZEA, numa gama de concentrações na vizinhança de 0,4 e 1,6 mg/l, respectivamente. Esta combinação específica revelou-se a mais eficiente na indução de embriogénese somática neste sistema experimental. Embriões somáticos com aberrações morfológicas e fenómenos de foliose foram observados em todas as combinações testadas. O aparecimento de embriões malformados aumentou com o aumento da concentração de auxina e com o aumento da razão citocinina/auxina no meio de cultura (até 1,25 % do total dos

embriões). A ocorrência de foliose foi máxima no meio suplementado com 0,1 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA tendo sido observada em 100 % dos explantes inoculados.

## Introdução

Como foi referido na Introdução Geral, a cultura *in vitro* de linho tem sido objecto de estudo há mais de 25 anos (1, 2, 3, 4, 5, 6) mas, ainda é escasso o conhecimento sobre os factores que determinam a indução das diferentes vias de organogénese e de embriogénese somática nesta espécie. A obtenção de plantas de linho *in vitro* foi conseguida há muito tempo, a partir de protoplastos isolados (7, 8), mas os episódios de regeneração foram muito pouco frequentes e dependentes do genótipo (8). Estas investigações revelaram ainda a ocorrência de embriogénese somática a partir dos *calli* derivados de protoplastos de *L. alpinum*. Em 1986, Pretová e Williams (9) referiram o aparecimento de estruturas embrióides directamente a partir de segmentos de hipocótilo de *Linum usitatissimum* L., mas, até à data da publicação do artigo que esteve na base deste capítulo, não tinham sido encontradas mais referências à embriogénese somática nesta espécie, nem sobre a reconversão dos embriões induzidos a plântulas *in vitro*. Recentemente foi descrita a regeneração de alta eficiência por organogénese a partir de *calli* induzidos em culturas de anteras (10) e, num sistema semelhante ao nosso, a regeneração por embriogénese somática a partir de *calli* induzido em segmentos de hipocótilo de *Linum usitatissimum* L. (11).

Os objectivos deste trabalho experimental consistiram em:

- Determinar os efeitos do **tipo de explante** e da **suplementação hormonal** do meio MS (12) na indução, crescimento, qualidade e capacidades morfogénicas dos *calli* obtidos;
- Estudar a interacção hormonal auxina/citocinina/giberelina na indução de diferentes tipos de cultura (morfogénicas vs. não-morfogénicas);
- Optimizar um **protocolo** de micropropagação de plantas de linho por **embriogénese somática** e, globalmente,
- Estabelecer as condições experimentais básicas para a cultura *in vitro* do linho.

## Material e Métodos

### I – Material vegetal e condições de cultura

Sementes de linho (pertencentes à população nº 6 da colecção de germoplasma da ERCA-DRAEDM) foram sujeitas a um tratamento emoliente da testa por imersão em etanol a 70 % (v/v) durante 2 min. e esterilizadas superficialmente numa solução filtrada de hipoclorito de cálcio a 20 %, durante 10 min. Após várias lavagens em água desionizada esterilizada foram colocadas 5 a 6 sementes em tubos de cultura (13,5 x 3,0 cm) com meio basal MS (12) a pH 5,7, sem suplementação hormonal, contendo 2 % (p/v)<sup>1</sup> de sacarose e solidificado com agar (Vaz Pereira, IBERAGAR) a 0,8 % (MS0). A composição química do meio basal MS, a metodologia utilizada na sua preparação, bem como a manipulação das culturas encontram-se descritas em apêndice (Apêndice A). O material vegetal foi colocado em sala de culturas, durante 4 semanas, nas condições descritas na Tabela II.1. As plântulas obtidas por germinação das sementes *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes primários. A taxa de infecção das culturas de explantes obtidas deste modo foi negligenciável (< 1-2 %).

Tabela II.1 – Condições de crescimento das culturas em sala de culturas de ambiente controlado.

Temperatura	22 °C ( $\pm$ 3° C)
Fotoperíodo	16 horas
Intensidade luminosa	$\approx 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

<sup>1</sup> - Sempre que se omitirem do texto as grandezas em que é definida a %, é porque é definida numa base de p/v.

## 2 – Efeito do tipo de explante primário e da suplementação hormonal na resposta das culturas

Segmentos de raízes principais (SR), de hipocótilos (SH) e segmentos nodais cotiledonares (SC) foram distribuídos por tubos de cultura contendo meio basal MS (12) suplementado com uma das 3 combinações hormonais indicadas na Tabela II.2.

Tabela II.2 – Suplementações hormonais do meio basal MS (MS1, MS2 e MS3) testadas na indução de culturas *in vitro* de *Linum usitatissimum* a partir de diferentes tipos de explante primário.

Meio de cultura	Combinação hormonal (auxina + citocinina)	Concentração hormonal (mg/l)
MS1	NAA + KIN (MS1)	1,0 + 0,5
MS2	IBA + KIN (MS2)	0,6 + 0,5
MS3	2,4-D + ZEA (MS3)	0,5 + 0,25

Peso molecular (g/mol) dos fito-reguladores utilizados: NAA - 186,22; KIN - 215,2; IBA - 203,23; 2,4-D - 221,04; ZEA - 219,2.

As culturas foram mantidas nas condições descritas na Tabela II.1 durante 5 semanas. Após este período foi registado o número de culturas (n = 28 por cada tratamento) que apresentaram diferenciação de *calli*, de rebentos caulinares e/ou raízes adventícias e os valores expressos em percentagem (%).

Segmentos de hipocótilo (SH) obtidos a partir de plântulas germinadas em meio MS3 ou em meio MS sem qualquer suplementação (MS0), foram inoculados em meios MS suplementados com concentrações crescentes de 2,4-D ou IBA (0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/l) juntamente com 0,5 mg/l de ZEA, de modo a determinar o efeito da concentração auxínica na capacidade de regeneração de rebentos caulinares. Os resultados foram registados ao fim de um período de 40 dias.

## 3 – Crescimento de calli e capacidade rizogénica: efeito das auxinas 2,4-D e IBA e das citocininas KIN e ZEA

Fragmentos de *calli* em fase de crescimento activo provenientes dos meios MS2 e MS3, foram transferidos para meio MS4 (0,6 mg/l IBA + 0,25 mg/l ZEA) e também para os

meios MS2 e MS3 que funcionaram como controlos. A partir deste material seguiram-se duas abordagens:

- uma horizontal, onde se comparou, no final de 6 semanas de crescimento, os *calli* quanto às suas características de pigmentação/grau de compactação e capacidade rizogénica; e
- uma temporal, onde, ao fim de um período de estabilização nestes meios recorrendo a 6 subculturas de 4-5 semanas cada, se estudou o perfil de crescimento dos *calli* através de 9 amostragens pontuais efectuadas ao longo de um período de 8 semanas.

Para o ensaio do crescimento, amostras de 6-8 *calli*, seleccionados aleatoriamente, foram obtidas no tempo zero e ao fim de 3 e 7 dias e depois, uma vez por semana ao longo de 7 semanas. Cada *callus* foi limpo, pesado, ultracongelado (-70 °C) e liofilizado a 4  $\mu$ bar durante 24 h (Christ Alpha 2-4 LDC-1m) para determinação da biomassa.

Para caracterizar o crescimento dos *calli* nos diferentes tratamentos, os valores dos parâmetros cinéticos taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e tempo de duplicação de biomassa (td) foram determinados segundo as fórmulas abaixo indicadas. Durante a fase exponencial de crescimento dos *calli*,  $\mu$  é constante (13) e pode ser calculado pela equação:

$$\mu = (\ln x_i - \ln x_j) / (t_i - t_j) \quad \text{onde } x \text{ equivale à biomassa média dos } calli \text{ no tempo } i \text{ e no tempo } j.$$

O tempo que a cultura demora a duplicar a sua biomassa (td) está relacionada com  $\mu$  e pode ser calculada por:

$$td = \ln 2 / \mu$$

#### 4 – *Interacção entre auxina, citocinina e giberelina na indução de diferentes vias de diferenciação de tecidos a partir de segmentos de hipocótilo*

Foi realizada uma experiência factorial incompleta na qual 2,4-D, ZEA e GA<sub>3</sub> foram combinados em 4 concentrações (0,05, 0,2, 0,8 e 3,2 mg/l) em meio MS de acordo com um triângulo coordenado (fig. II.3 da secção de Resultados e Discussão deste capítulo). Um total de 21 explantes foram inoculados em cada uma das variantes hormonais e os resultados registados ao fim de 6 semanas.



### *5 – Optimização dos níveis de 2,4-D e ZEA no meio MS para indução de embriogénese somática a partir de segmentos de hipocótilo de linho*

Tendo por base os resultados da experiência anterior e o facto de se terem observado, embora numa frequência muito baixa, episódios de **embriogénese somática** no tratamento 0,2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l ZEA, foi realizada uma segunda experiência, testando novas concentrações de 2,4-D + ZEA centradas naquele tratamento. Assim, foram testadas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,4 mg/l de 2,4-D em combinação com 0,4, 0,8 e 1,6 mg/l de ZEA, num desenho factorial completo de 3x3, com 23-30 replicados por tratamento. No final de um período de 6 semanas, os resultados foram registados, após o que os embriões somáticos foram destacados e inoculados em meio MS sem suplementação hormonal (MS0) de modo a desenvolverem raízes a partir do pólo radicular, sendo mantidos nas condições ambientais descritas na Tabela II.1. A percentagem de plântulas completas obtidas a partir dos embriões somáticos, cultivados nestas condições, foi determinada ao fim de outro período de 6 semanas.

### *6 – Análise estatística*

As variáveis aleatórias estudadas que se apresentam sob a forma de frequências ou proporções (caso da percentagem de indução de embriogénese somática) foram analisadas estatisticamente pelo teste do  $\chi^2$ . As variáveis paramétricas contínuas foram analisados pelo teste da Análise de Variâncias (ANOVA). Relativamente à variável aleatória “nº médio de embriões somáticos por explante embriogénico” procedeu-se à transformação matemática “raiz quadrada do valor” para normalizar a distribuição da variável e estabilizar as variâncias. As comparações *post hoc* entre tratamentos foram analisadas com o teste HSD Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica@4.1 da StatSoft, Inc.

Em apêndice encontra-se um breve resumo dos aspectos fundamentais e pressupostos básicos dos testes estatísticos aplicados na análise de todos os dados obtidos durante o trabalho experimental (Apêndice B).

*7 – Observação de diferentes fases da ontogénese dos embriões somáticos por microscopia electrónica de varrimento. Alguns problemas técnicos.*

Algumas das culturas que apresentaram embriões somáticos foram ultracongeladas para observação de fases ontogénicas da embriogénese somática em microscopia electrónica de varrimento (SEM) e respectivo registo fotográfico (filme ILFORD 100 Asa).

Inicialmente, a metodologia empregue no processamento das amostras para SEM teve por base os protocolos correntes descritos como adequados para material biológico (14, 15). Procedeu-se a uma fixação química em gluteraldeído a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,2 M durante 2 h, seguida de uma fixação em gluteraldeído a 4 % no mesmo tampão durante 24 h. Posteriormente realizaram-se várias lavagens em tampão e finalmente em água desionizada. A desidratação foi realizada recorrendo a uma série de soluções de concentração crescente de etanol com uma última passagem em acetona pura antes da secagem ao ar à temperatura ambiente.

A observação do material vegetal à lupa mostrou que este surgia deformado e com células epidérmicas bastante colapsadas após secagem da acetona. De facto, um passo crítico na obtenção de material bem preservado consiste na secagem do solvente utilizado na desidratação dos tecidos. Isto deve-se às elevadas forças de tensão superficial que se exercem nos tecidos durante a evaporação desses fluídos à temperatura ambiente (14). O recurso à técnica de secagem do material biológico em acetona por uma última passagem em TMS (tetrametilssilano), que tem um ponto de ebulição e uma tensão superficial mais baixos que aquele solvente, também não ofereceu melhores resultados. O facto do material em questão ter uma dimensão razoável – *callus* com vários embriões somáticos e em diferentes fases do desenvolvimento – faz com que na fixação, o binómio tempo de exposição/eficiência de fixação seja difícil de resolver. E uma ineficiente fixação comprometerá o passo da secagem.

Pretendeu-se então testar uma outra metodologia para o processamento das amostras para SEM que pudesse, por um lado, evitar o passo da fixação química do material e, por outro, obviar o passo da secagem dos solventes ao ar. A liofilização de espécimes biológicos encontra-se igualmente descrita como técnica de secagem e oferece vantagens quando o objectivo consiste na preservação do tamanho e da estrutura tridimensional do material (14). Esta técnica encontra-se, contudo, pouco referida em

material vegetal. Assim, as amostras ultracongeladas instantaneamente em azoto líquido e conservadas a -70 °C foram liofilizadas, nas condições acima descritas, sem mais tratamento. Apesar da estrutura celular superficial não ter sido perfeitamente mantida por este método, havendo ainda algumas células colapsadas, a estrutura tridimensional dos embriões somáticos foi satisfatoriamente preservada, pelo que se adoptou este procedimento de fixação física. As amostras foram posteriormente metalizadas com filme de ouro, aplicado sob baixo vácuo, e observadas em SEM (Leica S360). A figura II.1 mostra alguns dos resultados obtidos no estudo sobre o efeito do método de secagem do material vegetal na preservação da estrutura.

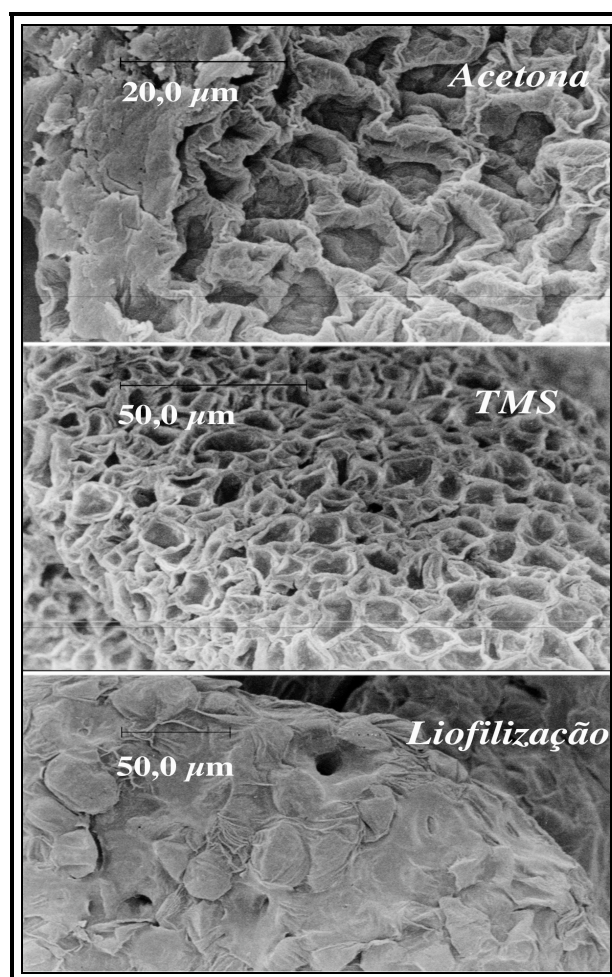


Figura II.1 – Fotomicrografias da epiderme de embriões somáticos obtidas por microscopia electrónica de varrimento (SEM) após o material biológico fixado e desidratado ter sido submetido a secagem da acetona; ou do TMS ao ar; ou após material não fixado e ultracongelado ser sujeito directamente a liofilização.

## Resultados e Discussão

### *1 – Efeito do tipo de explante primário e dos reguladores de crescimento na indução de calli e morfogénese de culturas in vitro*

Nas condições experimentais ensaiadas foram induzidas culturas de *calli* numa percentagem elevada (> 65 %) independentemente do tipo de explante primário ou da combinação hormonal testada. Os resultados estão sumariados na Tabela II.3. Como se pode verificar, o tipo de explante primário não teve influência relevante na percentagem de *calli* induzidos. Contrariamente, a suplementação hormonal teve um efeito significativo, tendo sido observado o valor mais baixo de indução com a combinação IBA + KIN e o mais elevado com 2,4-D + ZEA. Os *calli* mantidos com esta suplementação apresentaram crescimento vigoroso, um aspecto compacto e clorofilino e ausência de capacidade rizogénica (Tabela II.3). A indução de rebentos caulinares, directa e indirecta, foi mais elevada com a combinação IBA + KIN, tratamento que conduziu à indução de *calli* esbranquiçados e com elevada capacidade rizogénica, semelhante à registada com *calli* induzidos com NAA + KIN (Tabela II.3). Ao contrário do que ocorre em outras espécies, como por exemplo em *Helianthus* sp. (16), a indução de *calli* de linho, sendo bastante elevada (> 76 %), parece ser independente do tecido da plântula utilizado como explante primário. Porém, no que diz respeito às capacidades morfogénicas dos *calli* produzidos, o tipo de explante teve uma influência muito significativa. Adicionalmente, os resultados mostram que, no linho, foi possível regenerar caules ou raízes adventícias a partir de qualquer explante obtido da parte aérea da plântula, nomeadamente a partir de SH e de SC (Tabela II.3). Este resultado é, contudo, bastante diferente de resultados obtidos com outras espécies onde a regeneração de caules adventícios é altamente dependente do tipo de explante primário (17). Pode ainda observar-se que enquanto os explantes SC se revelaram mais adequados para indução de rebentos caulinares, quer adventícios quer a partir de meristemas axilares, os explantes SH apresentaram resposta rizogénica mais acentuada.

A resposta rizogénica manifestada pelos explantes SR foi semelhante à dos SC, no entanto não apresentaram qualquer competência na indução de caules.

Tabela II.3 – Efeito das combinações hormonais na indução de *calli*, de raízes e de rebentos caulinares a partir de diferentes tipos de explante de linho, ao fim de 5 semanas de cultura. Para cada variável experimental e em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

Variáveis experimentais	Variações testadas	Indução de <i>callus</i> (%)	Indução de raízes (%)	Indução de caules (%)
Tipo de explante	SC	78 (a)	33 (b)	38 (a)
	SH	87 (a)	53 (a)	23 (b)
	SR	76 (a)	26 (b)	0 (c)
Combinação hormonal	NAA + KIN (MS1)	82 (b)	68 (a)	13 (b)
	IBA + KIN (MS2)	65 (c)	60 (a)	53 (a)
	2,4-D + ZEA (MS3)	97 (a)	0 (b)	25 (b)

A transferência de *calli* de meio MS2 para meio MS4 (quando se substituiu KIN por ZEA), originou *calli* clorofilinos e de maior tamanho que os desenvolvidos no meio MS2, i.e., com características semelhantes aos *calli* desenvolvidos em meio MS3, e com capacidade rizogénica apenas ligeiramente diminuída (de 60 para 50 %). Por outro lado, quando os *calli* inoculados em meio MS4 eram provenientes de meio MS3 (quando 2,4-D foi substituído por IBA), onde não tinha ocorrido regeneração de raízes, verificou-se indução de rizogénese em 33 % das culturas de *calli*. Com estes resultados foi possível mostrar o papel preponderante da citocinina ZEA na indução de clorofila e de elevadas taxas de crescimento de *calli* e, atribuir à suplementação auxínica com 2,4-D, independentemente da citocinina, a indução de *calli* sem capacidade rizogénica.

Na figura II.2 estão representados os resultados obtidos nos ensaios efectuados para avaliar o efeito da concentração auxínica na capacidade de regeneração de caules adventícios a partir de explantes SH. Como se pode verificar, IBA e 2,4-D tiveram

efeitos aparentemente opostos; 2,4-D, na concentração mais baixa, foi mais eficiente na regeneração de rebentos caulinares que IBA na mesma concentração. Contudo, o aumento na concentração de IBA no meio de cultura estimulou a indução e o desenvolvimento de rebentos caulinares, enquanto que concentrações crescentes de 2,4-D se traduziram na inibição drástica desta resposta morfogénica (séries MS0). Estes resultados sugerem que 2,4-D é mais eficiente que IBA na indução de caulogénese, apresentando máximos a baixas concentrações ( $\leq 0,25$  mg/l), enquanto que os níveis óptimos de IBA situar-se-ão em concentrações iguais ou superiores a 1,0 mg/l. De facto, como mostra a figura II.2, a presença de 2,4-D no meio de germinação e crescimento das plântulas que constituíram a fonte de explantes (ver séries MS3), traduziu-se numa inibição da capacidade de regeneração e desenvolvimento de rebentos caulinares a partir de explantes SH. Este efeito deveu-se muito provavelmente a um aumento nos níveis endógenos de auxina nos explantes primários o que vem corroborar a hipótese dum efeito tóxico de elevadas concentrações de 2,4-D na regeneração de caules. A hipótese daquele efeito inibitório ter sido devido ao aumento nos níveis endógenos de ZEA foi rejeitada pelo facto de que, como veremos mais adiante neste capítulo, o aumento dos níveis de ZEA estimularem a caulogénese a partir de explantes SH.

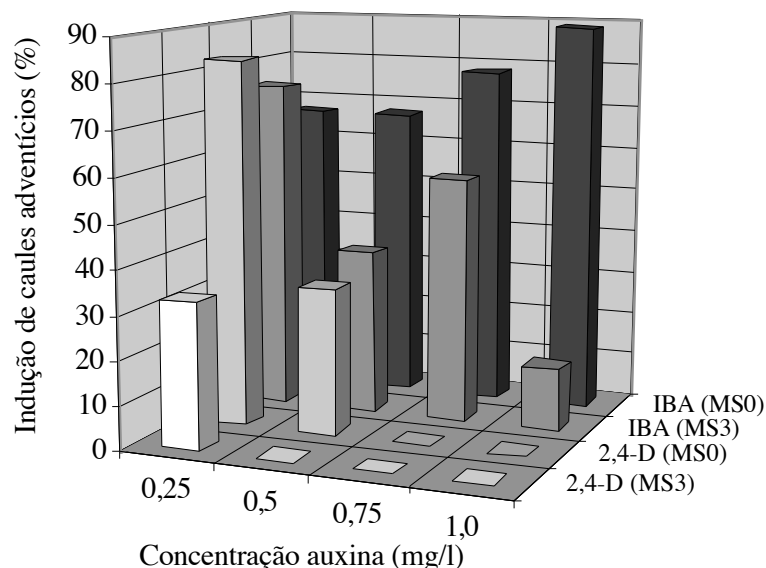


Figura II.2 – Efeito de concentrações crescentes de auxina (2,4-D ou IBA) na presença de 0,5 mg/l de ZEA, na indução de caules adventícios a partir de explantes SH. Os explantes foram obtidos a partir de plântulas crescidas *in vitro* em meio de cultura sem suplementação hormonal (MS0) ou suplementado com 0,5 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l ZEA (MS3).

## 2 – Determinação do efeito da suplementação hormonal no crescimento de calli não-morfogénico

Os perfis de crescimento de *calli* não-morfogénicos mantidos em meio MS suplementado com diferentes combinações hormonais encontram-se representados na figura II.3. Como se pode constatar, estes perfis foram bastante diferentes, não tendo ocorrido um crescimento significativo dos *calli* mantidos em meio MS2. Adicionalmente, *calli* desenvolvidos em meio MS3 (2,4-D + ZEA) foram diferentes dos obtidos em meio MS4 (IBA + ZEA) ao nível de significância de 6 %. Estes resultados confirmam as observações qualitativas anteriores que indicaram que o meio MS suplementado com 2,4-D + ZEA (MS3) foi o mais eficiente para o crescimento de *calli* de linho. Como se pode verificar pela análise da figura, *calli* mantidos em meio MS3 apresentaram um perfil de crescimento do tipo sigmoidal, enquanto que os mantidos em meio MS4 apresentaram um perfil de crescimento do tipo linear bifásico, sem uma fase exponencial evidente. Por este motivo, a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e o tempo de duplicação (td) foram apenas determinados para caracterizar o crescimento dos *calli* em meio MS3, tendo-se obtido os valores de  $\mu = 0,049 \text{ d}^{-1}$  e de  $\text{td} = 14 \text{ d}$ . Em estudos de crescimento de *calli* de *Euphorbia characias*, utilizando condições experimentais semelhantes às descritas, Fernandes-Ferreira *et al.* (18) concluíram que, das várias auxinas testadas conjuntamente com ZEA, 2,4-D foi também a auxina que promoveu as mais elevadas taxas de crescimento. Não foram encontradas referências relativamente a estudos de crescimento de *calli* de linho, contudo, os valores das taxas de crescimento de *calli* determinados foram relativamente baixos quando comparados com os descritos para culturas de outras espécies [0,085  $\text{d}^{-1}$  para *Euphorbia characias* (19); 0,08 – 0,095  $\text{d}^{-1}$  para *Sylibum marianum* (20); 0,158 – 0,165  $\text{d}^{-1}$  para *Cynara cardunculus* (21)]. Os dados são no entanto referentes apenas a uma combinação hormonal não tendo as concentrações sido optimizadas para produção de biomassa deste tipo de culturas.

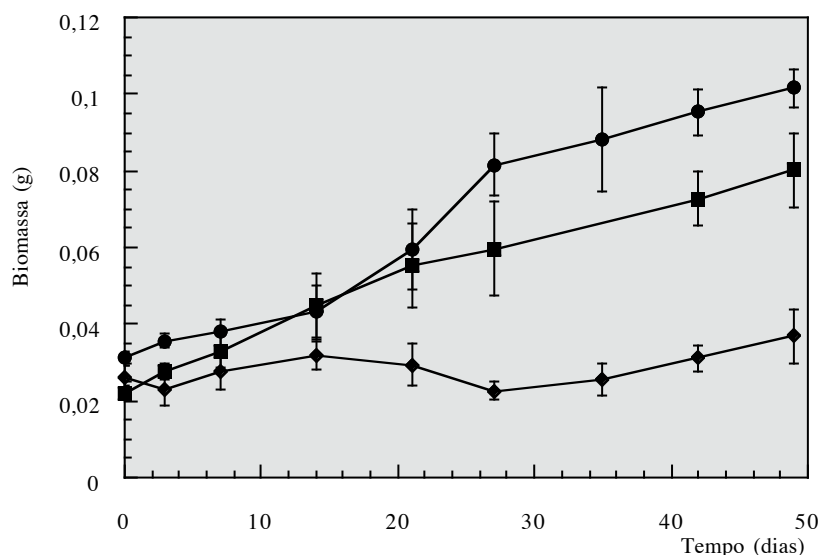


Figura II.3 – Crescimento de *calli* não-morfogénicos em meio MS2 (◆), MS3 (●) e MS4 (■). As barras de erro correspondem a  $\pm$ SE.

### 3 – Interação entre 2,4-D, ZEA e $GA_3$ na indução de diferentes tipos de culturas a partir de segmentos de hipocótilo

A acção simultânea de 2,4-D, ZEA e  $GA_3$ , na indução de diferentes vias de diferenciação (caulogénese, rizogénese e embriogénese somática) e de indução de *callus* (calogénese) foi estudada partindo de explantes SH de linho, e os principais resultados obtidos encontram-se representados na figura II.4. No que diz respeito à rizogénese, os resultados obtidos estão basicamente de acordo com outros já descritos (22, 23, 24). Como se pode verificar, a formação de raízes foi estimulada por concentrações crescentes de 2,4-D no meio de cultura e inibida fortemente por ZEA, dum modo igualmente dependente da concentração. Como já foi atrás referido, na presença de 0,5 mg/l de ZEA, IBA foi mais eficiente na regeneração de raízes a partir de explantes SH que 2,4-D na mesma concentração. Estes resultados juntamente com os obtidos no ensaio anterior, sobre indução de rebentos caulinares por efeito de concentrações crescentes de IBA ou de 2,4-D, parecem indicar que este último fito-regulador tem uma acção mais intensa e com limites de tolerância mais apertados que IBA. De facto,



relativamente à indução de rebentos caulinares, em presença de ZEA a 0,5 mg/l, 2,4-D teve um efeito estimulador a concentrações muito baixas começando a ter um efeito inibitório acentuado logo a 0,5 mg/l ( $\approx 2 \mu\text{M}$ ), ao passo que IBA teve um efeito bastante positivo que se manteve de 0,25 mg/l até 1,0 mg/l (fig. II.2 e II.4). Em contrapartida, no que diz respeito à rizogénese, o 2,4-D só começou a ter um efeito positivo a partir de concentrações relativamente elevadas, sendo a percentagem de indução muito afectada por variações crescentes na concentração de ZEA (fig. II.4).

Embora a utilização de razões auxina:citocinina muito baixas, seja prática comum para a indução de rebentos caulinares em culturas *in vitro* de linho (25, 26), este fenómeno organogénico parece ser mais determinado por baixas concentrações de 2,4-D e menos por baixas razões auxina:citocinina. Como foi demonstrado pelos resultados obtidos, independentemente da concentração de ZEA utilizada, concentrações crescentes de 2,4-D suprimem o desenvolvimento de rebentos caulinares a partir de explantes SH de linho. De modo semelhante, Yuan *et al.* (27) verificaram que concentrações crescentes de 2,4-D até 0,5 mg/l inibiam a formação destes rebentos a partir de explantes de *Catharanthus roseus* independentemente da presença de benziladenina (BA) em concentrações de 0 a 7 mg/l. Tal como foi observado por nós com IBA, concentrações crescentes de NAA até 1,0 mg/l resultaram em estimulações sucessivamente mais acentuadas da caulogénese.



de *callus* foi de apenas aproximadamente 50 %. Estes resultados sugerem que a obtenção de culturas de *calli* de linho constitui um procedimento relativamente facilitado, na medida em que os explantes não exibem exigências muito específicas relativamente à suplementação hormonal do meio. Em contrapartida, os processos de diferenciação morfogénica revelaram-se mais restritivos, com exigências mais apertadas, nomeadamente em relação aos tipos e níveis de auxina e citocinina.

Embora numa frequência muito baixa (3 casos em 18 explantes), observou-se o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de *calli* no tratamento 0,2 + 0,8 + 0,05 mg/l (2,4-D + ZEA + GA<sub>3</sub>). A figura II.5 mostra algumas fases do desenvolvimento de ES de linho em SEM. Como se pode verificar pela figura, a ocorrência de diferentes estádios de desenvolvimento de ES num mesmo *callus*, induzido a partir de explantes SH de linho, revela a natureza assíncrona da embriogénese somática neste sistema.

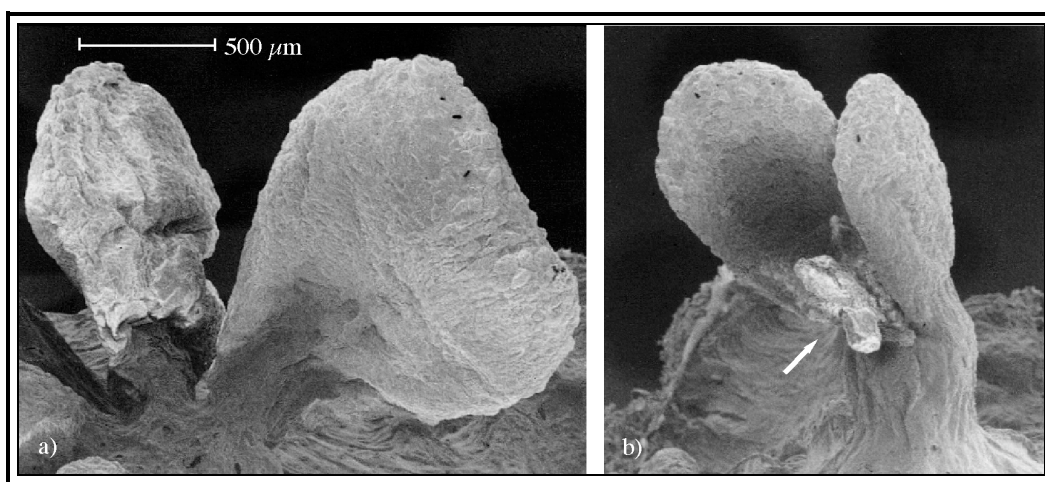


Figura II.5 – Embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento, observados em microscopia electrónica de varrimento. Foto a) da esquerda para a direita, embrião na fase de torpedo e de coração; foto b) embrião na fase cotiledonar, já com algum desenvolvimento do epicótilo (seta).

### 3.1 – Estudo do efeito da suplementação hormonal na indução de embriogénese somática

Dado que se tinham observado episódios esporádicos de embriogénese somática apenas numa concentração reduzida de GA<sub>3</sub> ( $\approx$  150 nM) e visto não terem sido encontradas

referências bibliográficas sobre giberelinas associadas à indução da embriogénese somática, excluiu-se este fito-regulador da experiência em que se pretendia otimizar as condições hormonais do meio para indução deste processo morfogénico. Nesta experiência verificou-se, de facto, que a exclusão da giberelina do meio de cultura não só reduziu o tempo de expressão embriogénica (aparecimento dos primeiros embriões somáticos) de 4 semanas para 10 dias, como aumentou a percentagem de indução para valores de 87 % (Tabela II. 4). De modo geral, com a excepção do tratamento 0,1 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA, a percentagem de indução de embriogénese somática foi bastante elevada (> 75 %) em todos os tratamentos (Tabela II.4).

De acordo com alguns autores (28), a idade do explante pode ter um papel determinante na competência embriogénica dos *calli*. Com o objectivo de estudar o efeito da idade das plântulas e da posição relativa do segmento no hipocótilo, usado como explante primário, na capacidade embriogénica dos *calli* obtidos foi realizado um estudo paralelo. Neste estudo usaram-se plântulas crescidas *in vitro* com 1, 2 e 3 semanas, tendo-se inoculado os dois segmentos hipocotiledonares de uma mesma planta – segmentos proximal e distal (fig. II.6) – no mesmo tubo de cultura num total de 42 culturas. O meio embriogénico utilizado foi o meio MS suplementado com 0,4 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA. Ao longo de um período de 8 semanas registou-se o aparecimento de embriões somáticos, em ambos os segmentos, nas várias culturas. Genericamente, os resultados mostraram que uma variação na idade das plântulas de linho, usadas como fonte de explantes primários, de 1 a 3 semanas (fig. II.6) não era determinante na capacidade embriogénica, desde que se usasse o segmento sub-cotiledonar (ou distal). Os resultados obtidos encontram-se descritos nas figuras II.7a), b) e c). Comparando as figuras II.7 a) e b), verifica-se que a redução na percentagem de indução de embriogénese somática se deveu a uma diminuição na viabilidade dos explantes primários SH, com a idade das plântulas. A análise da figura II.7 c) revela que foi apenas a viabilidade dos segmentos proximais (fig. II.6), e portanto a capacidade embriogénica, que foi afectada pela idade das plântulas.

Na experiência factorial 3x3 descrita, foram utilizados explantes sub-cotiledonares obtidos a partir de plântulas já com 4 semanas, pelo que o sucesso na indução de embriogénese somática obtido na experiência 3x3 (Tabela II.4) revelou que este tipo de explante – segmento sub-cotiledonar (SH) – é bastante coerente na resposta ao estímulo

embriogénico, provavelmente, porque se mantém num estado fisiológico semelhante ao longo do período de tempo considerado.

Tabela II.4 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ZEA na indução de embriogénese somática a partir de explantes SH de linho. Cada fito-regulador foi testado em 3 concentrações diferentes num desenho factorial completo. As variáveis aleatórias estimadas foram a percentagem de indução de embriogénese, medida como o número de explantes embriogénicos sobre o total, e a percentagem de conversão de embriões, medida como o número de embriões que enraizaram ao fim de 6 semanas em meio MS sem suplementação hormonal. Em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

2,4-D + ZEA (mg/l)	Explantes embriogénicos (%)	Número de embriões inoculados	Embriões com raízes (%)
0,1 + 0,4	93,3 (a)	40	18,4 (a)
0,1 + 0,8	87,5 (a,b)	22	15,0 (a,b)
0,1 + 1,6	29,2 (c)	12	0,0
0,2 + 0,4	100 (a)	16	25,0 (a,b)
0,2 + 0,8	87,0 (a,b)	18	22,0 (a,b)
0,2 + 1,6	75,0 (b)	24	8,3 (a)
0,4 + 0,4	100 (a)	27	19,2 (a,b)
0,4 + 0,8	100 (a)	24	16,7 (a,b)
0,4 + 1,6	100 (a)	24	41,7 (b)



Figura II.6 – Plântulas de linho germinadas *in vitro* em meio MS0, com 1, 2 e 3 semanas. Estão ainda representados os segmentos distal (a) e proximal (b) do hipocótilo utilizados para estudar o efeito da posição relativa do segmento na capacidade embriogénica do explante SH.

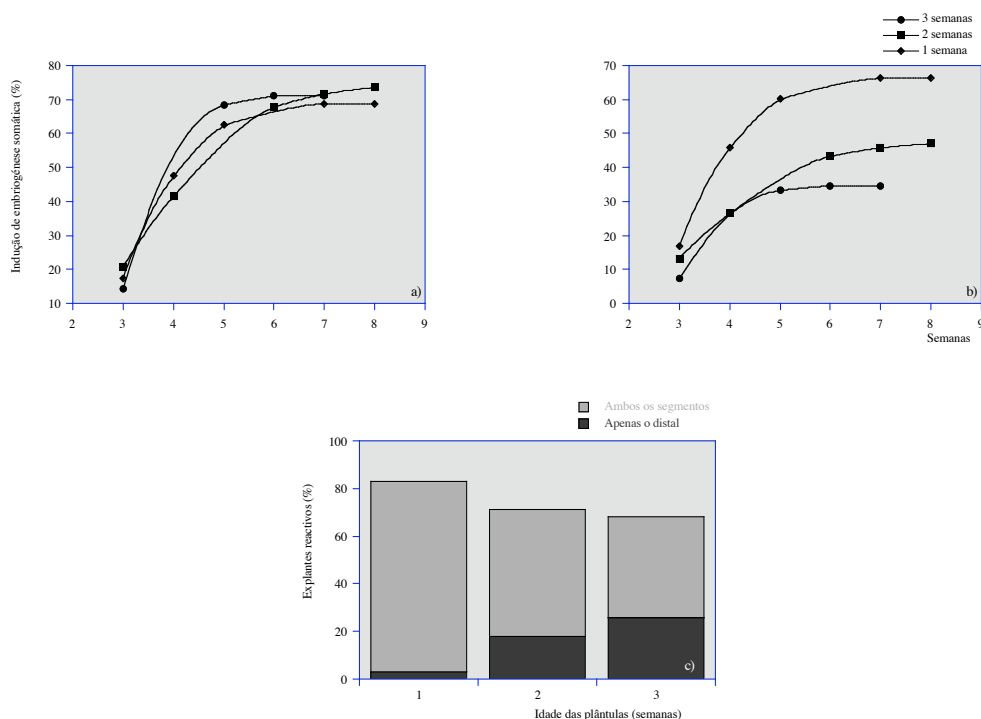


Figura II.7 – Indução de embriogénese somática em explantes SH obtidos a partir da região distal e proximal do hipocótilo de plântulas crescidas *in vitro* com 1, 2 ou 3 semanas, ao longo de um período de 8 semanas. Os valores estão expressos em percentagem do número de explantes viáveis (ou reactivos) (II.7a) ou do número total de explantes inoculados (II.7b). Fig. II.7c) Influência da idade das plântulas na percentagem de culturas que apresentaram apenas o explante SH distal ou ambos os segmentos viáveis (ou reactivos) no final de 3 semanas.

Um aspecto interessante destes resultados foi o facto de se terem encontrado concentrações de 2,4-D efectivas na indução de embriogénese somática de linho relativamente baixas (0,1 – 0,4 mg/l), quando comparadas com concentrações capazes de induzir embriogénese somática em outras espécies (5 – 60 mg/l para *Arachis hypogea* (29); 2 – 5 mg/l para *Hordeum vulgare* (30); 8 – 29 mg/l para *Glycine max* (31)), embora noutras, designadamente *Camellia japonica* (32), os valores tenham sido mais próximos (1,0 mg/l). É de admitir que a ampla gama de concentrações de 2,4-D indutoras de embriogénese somática nas diferentes espécies seja devida à variabilidade de condições de cultura e do tipo de material vegetal utilizado como explante primário.

Para avaliar a capacidade embriogénica das culturas, para além da percentagem de indução, determinou-se também o número médio de embriões somáticos produzidos por explante embriogénico (fig. II.8). Embora o efeito global da concentração de 2,4-D na

produção de embriões somáticos tenha sido estatisticamente significativo, a ANOVA revelou que a fonte de variabilidade mais importante ( $P < 0,001$ ) foi a interação entre auxina e citocinina. Assim, de acordo com Compton (33), a influência do 2,4-D e da ZEA na embriogénese somática do linho não deverá ser discutida separadamente. Na figura II.8, pode observar-se um óptimo bimodal nas combinações hormonais 0,1 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l ZEA e 0,4 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA e 3 combinações que resultaram nas mais baixas frequências de embriões somáticos. Os valores mínimos corresponderam ao tratamento onde a razão ZEA/2,4-D foi a mais alta (16x) e aos tratamentos onde a razão foi mais baixa (1 e 2x) (fig. II.8). Todas as outras combinações proporcionaram resultados estatisticamente semelhantes. Este resultado indicou que, ao contrário do que ocorre em outras espécies, como por exemplo em *Hevea brasiliensis* (34), a expressão da embriogénese somática não está apenas relacionada com o estabelecimento de um balanço entre diferentes fito-reguladores endógenos ou aplicados exogenamente, mas também com os níveis específicos destes compostos em acção.

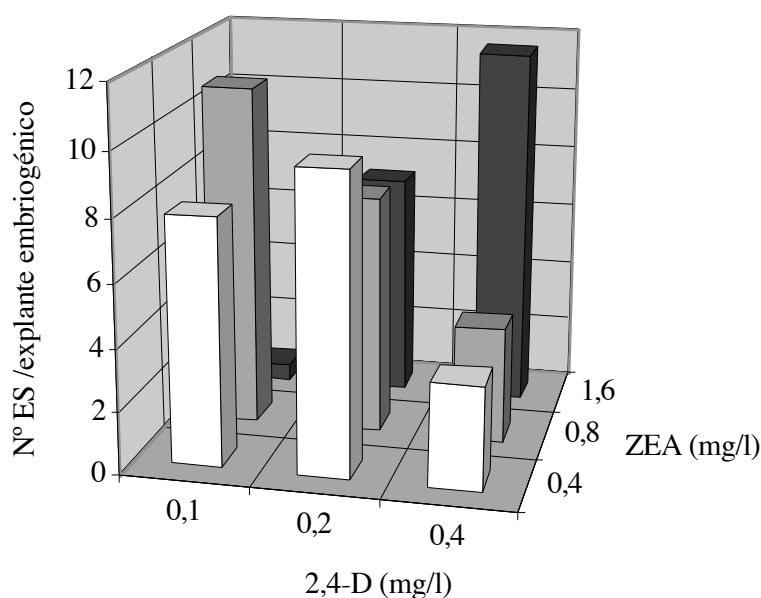


Figura II.8 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ZEA na frequência de embriões somáticos induzidos a partir de explantes SH.

### 3.2 – Capacidade de conversão dos embriões somáticos em plântulas

Os embriões somáticos de linho induzidos com este sistema experimental eram aparentemente unipolares, desenvolvendo apenas parte aérea enquanto mantidos no meio de indução. Nestas condições apresentavam um hipocótilo e cotilédones normais mas, enquanto ligados aos *calli* de que derivaram, não apresentavam desenvolvimento radicular. Dum modo geral, a transferência dos embriões para um meio sem fito-reguladores (MS0) permitiu o desenvolvimento normal do ápice radicular convertendo os embriões em plântulas completas, com sistema radicular bem desenvolvido (Tabela II.4). Verificou-se, contudo, que os embriões induzidos com 0,1 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA, suplementação que se tinha revelado a menos eficiente na indução embriogénica (29,2 %, Tabela II.4), foram os únicos que não apresentaram desenvolvimento do sistema radicular (Tabela II.4). Por outro lado, a suplementação 0,4 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA, que tinha simultaneamente induzido a mais elevada percentagem de indução (100 %, Tabela II.4) e o maior número de embriões por explante (fig. II.8), foi também aquela com a qual se obteve a mais alta taxa de conversão de embriões após transferência para meio MS0 (Tabela II.4). Estes resultados sugerem que, embora exista uma larga gama de combinações de concentrações de 2,4-D + ZEA adequadas para a indução de embriões somáticos com frequências razoáveis (> 7/explante), a combinação 0,4 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA (MS5) é, provavelmente, aquela que proporciona maior número de verdadeiros embriões bipolares.

### 3.3 – Embriogénese somática anormal. Fenómenos de foliose

Neste sistema experimental registou-se o aparecimento de embriões somáticos com malformações, em todos os tratamentos hormonais testados, com frequências que foram de 0,4 a 2,7 embriões malformados/explante embriogénico. A ocorrência de embriões com aberrações morfológicas aumentou com o aumento da concentração de 2,4-D e com o aumento da razão citocinina/auxina (fig. II.9). As aberrações eram geralmente relacionadas com o número de cotilédones dos embriões, tendo-se encontrado embriões com 1 cotilédone, parcial ou totalmente fundido em forma de trompa, o tipo mais comum (Tabela II.5), e embriões com cotilédones supranumerários (3 ou mais). Encontraram-se ainda embriões somáticos fundidos pelo hipocótilo, parcialmente pela



porção proximal ou mesmo ao longo de todo o comprimento do hipocótilo. A figura II.10, na qual se podem ver micrografias de SEM, mostra exemplares evidenciando diferentes tipos de aberrações morfológicas. Todas estas aberrações foram já descritas noutras espécies (15, 35). A conversão dos embriões malformados em plântulas completas em meio MS0 foi, contudo, semelhante à dos normais.

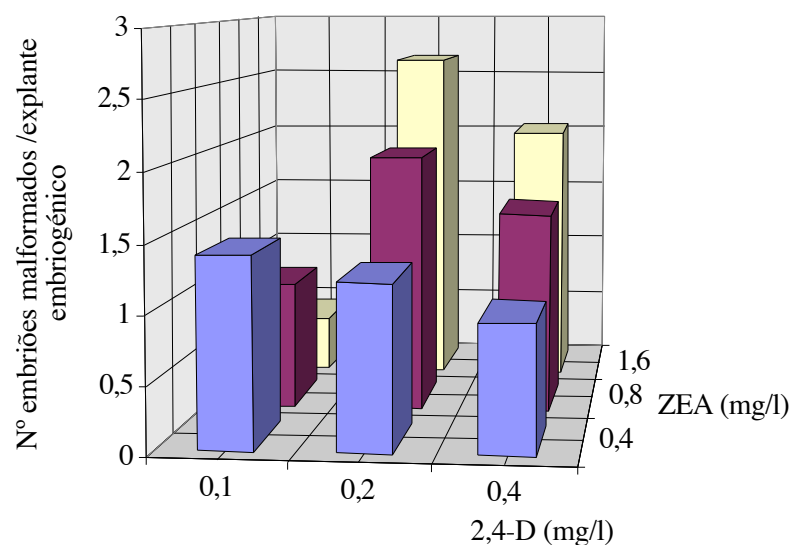


Figura II.9 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ZEA na frequência de embriões somáticos malformados induzidos a partir de explantes SH.

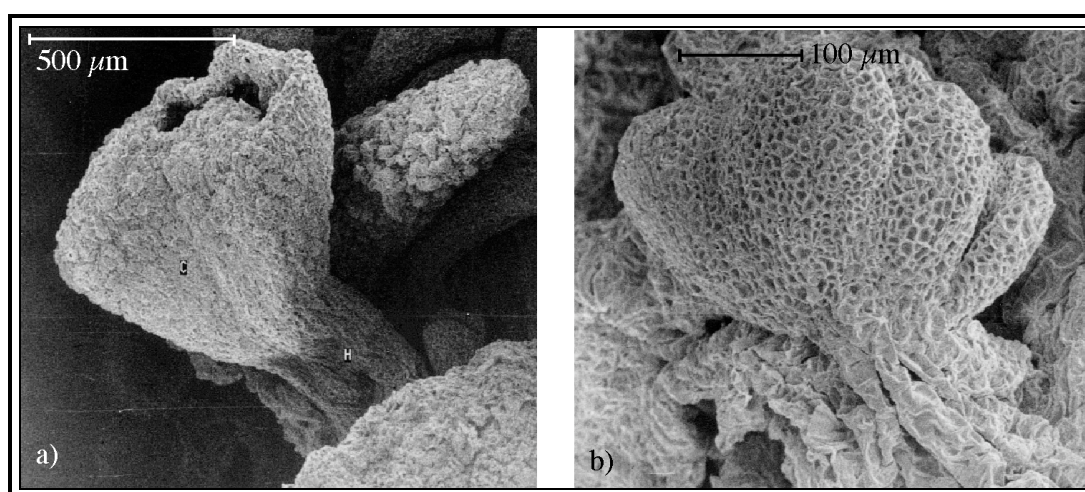


Figura II.10 - Fotomicrografias de embriões somáticos com aberrações cotiledonares obtidas em microscopia electrónica de varrimento. Foto a) embrião com um cotilédone fundido; foto b) embrião com cotilédones supranumerários.

A foliose, um fenómeno morfogénico anormal que se caracteriza pela formação de estruturas tipo foliar, de grande dimensão, clorofilinas e translúcidas a partir do *callus*, ocorreu independentemente do tipo de tratamento hormonal. Como é mostrado na Tabela II.5, ocorreu foliose em 8 aos 100 % de explantes inoculados, tendo sido obtido o valor mais elevado no tratamento com a razão citocinina/auxina mais elevada (16x). Curiosamente, este tratamento foi o único que não induziu ES com outras aberrações para além da de possuírem cotilédones supranumerários (Tabela II.5).

Tabela II.5 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ZEA no número de embriões somáticos malformados por explante embriogénico de linho e na ocorrência de foliose como percentagem dos explantes inoculados.

2,4-D + ZEA (mg/l)	ES com 1 cotilédone	ES com 3 ou mais cotilédones	ES fundidos	ES com outras malformações	Foliose (%)
0,1 + 0,4	0,75	0,29	0,29	0,07	10,0
0,1 + 0,8	0,33	0,57	0,05	0	16,7
0,1 + 1,6	0	0,43	0	0	100
0,2 + 0,4	0,67	0,17	0,13	0,17	8,3
0,2 + 0,8	0,70	0,15	0,30	0,80	52,0
0,2 + 1,6	0,91	0,43	0,17	1,13	37,5
0,4 + 0,4	0,61	0,06	0,06	0,22	20,8
0,4 + 0,8	0,78	0,08	0,09	0,61	30,4
0,4 + 1,6	0,38	0,17	0,25	1,25	16,7

Numa revisão crítica sobre embriogénese (36) foram referidos vários mutantes espontâneos de *Arabidopsis* com alterações no padrão morfológico apical-basal e radial das plântulas, semelhantes às malformadas descritas neste trabalho. Estas alterações no padrão normal de desenvolvimento de embriões podem ser causadas quer por mutação quer por manipulação da composição do meio, levando à expressão de certos genes em contextos morfológicos errados (36). Verificou-se também que a maior parte dos mutantes referidos tinha capacidade de conversão em plantas normais, o que leva a supôr que eram alterações ultrapassáveis no decurso do desenvolvimento da planta.

Embora a origem celular dos embriões somáticos seja diferente da dos zigóticos, ambos os padrões de desenvolvimento apical-basal e radial se formam de maneira semelhante.

O papel dos gradientes auxínicos na formação do padrão apical-basal tem sido questionado em muitos sistemas. De facto, a inibição do transporte polar de auxinas levou ao aparecimento de embriões com cotilédones fundidos em *Brassica juncea* (37) e em *Arabidopsis* (mutantes *gnom*) (38). Em mutantes *monopteros* de *Arabidopsis* (sem formação de raíz) foi sugerido que a alteração fenotípica fosse igualmente devida a uma alteração no fluxo polar auxínico (39). Estes resultados parecem então sugerir que o transporte polar determinará a transição da simetria radial para bilateral no embrião globular das dicotiledóneas (40). Já a multiplicação de cotilédones parece resultar duma alteração no balanço local entre as concentrações de auxina e citocinina que vai influenciar a formação do número e orientação correctas dos cotilédones no embrião em fase globular tardia (40). Pela observação da Tabela II.5 verifica-se que a maior frequência de ES com cotilédones supranumerários está associada a uma razão citocinina/auxina muito particular ( $> 8x$ ) independentemente das concentrações específicas. O aparecimento de ES fundidos encontra-se de igual modo relacionado com uma razão específica ( $4x$ ). Como veremos no próximo capítulo, a germinação de sementes de linho em meios suplementados com auxinas e citocininas conduziu, do mesmo modo, a alterações morfológicas profundas nas plântulas desenvolvidas nestes meios. Globalmente, estas evidências experimentais corroboram a ideia de um papel importante do transporte polar e/ou gradiente auxínico no padrão normal de desenvolvimento quer de embriões somáticos quer de embriões zigóticos, sendo o estágio globular uma fase crítica da embriogénese.

Na figura II.11 poderão visualizar-se diferentes tipos de cultura de linho obtidas *in vitro* de acordo com os diferentes ensaios aqui descritos.



### *Conclusões e perspectivas*

Apesar de não se ter realizado um estudo exaustivo sobre o efeito dos tipos de explante e dos reguladores de crescimento nos diferentes processos de indução de *callus* e diferenciação de tecidos, órgãos ou embriões a partir de explantes de linho, foi possível, com base neste conjunto de ensaios mais ou menos interdependentes, começar a construir uma base racional para o estabelecimento de culturas *in vitro* de linho.

- Segmentos de hipocótilo sub-cotiledonares constituem explantes com respostas elevadas e reprodutíveis ao estímulo embriogénico, ao passo que todas as restantes porções da plântula jovem são adequadas à indução de *callus*;
- A indução e crescimento de *calli* clorofilino ocorre numa ampla gama de concentrações de 2,4-D (0,2 – 3,2 mg/l) e de ZEA (0,05 – 3,2 mg/l);
- Meio rizogénico é conseguido preponderantemente utilizando concentrações elevadas de 2,4-D e concentrações reduzidas de ZEA; inversamente,
- Meio caulogénico é conseguido com concentrações elevadas de IBA (1,0 mg/l) ou baixas de 2,4-D (0,05 mg/l) em presença de concentrações elevadas de ZEA (0,8 – 3,2 mg/l), sendo potenciado com concentrações intermédias de GA<sub>3</sub> (0,2 – 0,8 mg/l);
- A embriogénese somática é conseguida a partir de explantes SH numa banda larga de combinações de concentrações de 2,4-D + ZEA, sendo que a combinação 0,4 + 1,6 mg/l foi a que simultaneamente proporcionou melhores resultados em termos de embriogénese e de conversão dos embriões em plantas inteiras.

Devido ao aparecimento de fenótipos morfollogicamente aberrantes, durante a germinação de embriões de linho *in vitro*, pela manipulação da suplementação hormonal do meio de cultura, este sistema experimental parece adequado ao estudo dos padrões de desenvolvimento embriogénico, quer somático quer zigótico, e da influência hormonal na determinação desses padrões.

## Bibliografia

- 1 **Rybczynsky J.J.** (1975) Callus formation and organogenesis of mature cotyledons of *Linum usitatissimum* L. var. Szokijskij *in vitro* culture. *Genetica Polonica* 16 No. 2.
- 2 **Gamborg O.L.** e **Shyluk J.P.** (1976) Tissue culture, protoplasts and morphogenesis in flax. *Bot. Gaz.* 137, 301-306.
- 3 **Mathews H.V.** e **Narayanaswamy S.** (1976) Phytohormone control of regeneration in cultured tissues of flax. *Z. Pflanzenphysiol.* 80, 436-442.
- 4 **Murray B.E.**, **Handyside R.J.** e **Keller W.A.** (1977) *In vitro* regeneration of shoots on stem explants of haploid and diploid flax (*Linum usitatissimum* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* 19, 177-186.
- 5 **Lane D.W.** (1979) Influence of growth regulators on root and shoot initiation from flax meristem-tips and hypocotyls *in vitro*. *Physiol. Plant.* 45, 260-264.
- 6 **McHughen A.** e **Swartz M.** (1984) A tissue-culture derived salt-tolerant line of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 177, 109-117.
- 7 **Barakat N.M.** e **Cocking E.C.** (1983) Plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Linum usitatissimum* L. (flax). *Plant Cell Reports* 2, 314-317.
- 8 **Ling H.Q.** e **Binding H.** (1987) Plant regeneration from protoplasts in *Linum*. *Plant Breeding* 98, 312-317.
- 9 **Pretová A.** e **Williams E.G.** (1986) Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 126, 155-161.
- 10 **Chen Y.**, **Kenaschuk E.** e **Dribnenki P.** (1998) High frequency of plant regeneration from anther culture in flax, *Linum usitatissimum* L. *Plant Breeding* 117, 463-467.
- 11 **Tejavathi D.H.**, **Sita G.L.** e **Sunita A.T.** (2000) Somatic embryogenesis in flax. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63, 155-159.
- 12 **Murashige T.** e **Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- 13 **Street H.E.** *Plant Tissue and Cell Culture* (2<sup>nd</sup> Edition), Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, 1977.
- 14 **Robards A.W.** e **Wilson A.J.** (Eds.) *Procedures in Electron Microscopy*. Cap. 11, John Wiley & Sons, Chichester, 1993.

- 15 **Konan** N.K., Sangwan R.S. e Sangwan B.S. (1994) Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Identification of parameters influencing the frequency of embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37, 91-102.
- 16 **Punia** M.S. e Bohorova N.E. (1992) Callus development and plant regeneration from different explants of six wild species of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.* 87, 79-83.
- 17 **Nakano** M., Hoshino Y. e Mii M. (1994) Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36, 15-19.
- 18 **Fernandes-Ferreira** M., Novais J.M. e Pais M.S. (1992) Hormonal control of triterpenols synthesis in *Euphorbia characias calli*. *Bioresource Technology* 39, 31-37.
- 19 **Fernandes-Ferreira** M., Novais J.M. e Pais M.S. (1989) *Calli* and suspension cultures for biomass production of *Euphorbia characias* L. subsp. *characias*. *Biotechnology Letters* 11, 259-264.
- 20 **Fevereiro** P., Cabral J.M.S., Fonseca M.M.R., Novais J.M. e Pais M.S. (1986) Callus and suspension culture of *Sylibum marianum*. Biosynthesis of proteins with clotting activity. *Biotechnology Letters* 8, 19-24.
- 21 **Figueiredo** A.C., Fevereiro P., Cabral J.M.S., Novais J.M. e Pais M.S. (1987) Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae). *Biotechnology Letters* 9, 213-218.
- 22 **Scott** T.K. Hormonal Regulation of Development II. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
- 23 **Pierik** R.L.M. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987.
- 24 **Fowler** M.W. e Warren G.S. Plant Biotechnology. Pergamon Press, Oxford, 1992.
- 25 **Cullis** C.A. e Cleary W. (1986) DNA variation in flax tissue culture. *Can. J. Genet. Cytol.* 28, 247-251.
- 26 **Marshall** G. e Courduries P. (1992) An assessment of somaclonal variation in linseed (*Linum usitatissimum*). *Ann. Appl. Biol.* 120, 501-509.
- 27 **Yuan** Y.J., Hu T.T. e Yang Y.M. (1994) Effect of auxins and cytokinins on formation of *Catharanthus roseus* G. Don multiple shoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37, 193-196.
- 28 **Santos** I., Guimarães I. e Salema R. (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Nerium oleander*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37, 83-86.
- 29 **Baker** C.M. e Wetzstein H.Y. (1994) Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36, 361-368.
- 30 **King** S.P. e Kasha K.J. (1994) Optimizing somatic embryogenesis and particle

- bombardment of barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. In vitro Cell. Dev. Biol. 30P, 117-123.
- 31 **Schoemaker** R.C., Amberger L.A., Palmer R.G., Oglesby L. e Ranch J.P. (1991) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L) Merr.]. In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P, 84-88.
- 32 **Pedroso** M.C e Pais M.S. (1995) Explant region-specific embryogenic competence and plant recovery in *Camellia japonica*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 31, 8-14.
- 33 **Compton** M.E. (1994) Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37, 217-242.
- 34 **Etienne** H., Sotta B., Montoro P., Miginiac E. e Carron M-P. (1993) Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). Plant Sci. 88, 91-96.
- 35 **Firoozabady** E. e DeBoer D.L. (1993) Plant regeneration via somatic embryogenesis in any cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 29, 166-173.
- 36 **Mordhorst** A.P., Toonen M.A. e De Vries S.C. (1997) Plant embryogenesis. Crit. Rev. Plant Sci. 16 (6), 535-576.
- 37 **Liu** C-M, Xu Z.H. e Chua N.H. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell 5, 621-630.
- 38 **Mayer** U., Buttner G. e Jurgens G. (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. Development 117, 149-162.
- 39 **Przemeck** G.K., Mattsson J., Hardtke C.S., Sung Z.R. e Berleth T. (1996) Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. Planta 200, 229-237.
- 40 **Schmidt** D.L., De Jong A.J. e De Vries S.C. (1994) Signal molecules involved in plant embryogenesis. Plant Mol. Biol. 26, 1305-1313.



# *III*

---

## *Diferenças no Conteúdo e Composição de Esteróis Livres Associadas à Embriogénese Somática, Organogénese e Crescimento de Calli.*

*Este capítulo foi baseado no artigo:*

“Differences in Free Sterols Content and Composition Associated with Somatic Embryogenesis, Shoot Organogenesis and Calli Growth of Flax”.  
Cunha A. e Fernandes-Ferreira M. (1997) Plant Science 124, 97-105.

## Resumo

Sendo os esteróis livres moléculas multifuncionais, de elevado impacto em processos celulares e do desenvolvimento das plantas, cujo conteúdo e composição podem estar sujeitos a regulação hormonal, estabeleceu-se como objectivo o estudo das fracções esterólicas de sementes, plântulas e diferentes tipos de cultura *in vitro* de linho, tendo-se determinado o efeito da suplementação hormonal na respectiva composição e na acumulação de cada um dos compostos na sua forma livre.

Um único meio de cultura foi usado para induzir embriogénese somática e caulogénese a partir de hipocótilos de linho. Com este sistema de co-indução de dois processos morfogénicos determinou-se, nas mesmas condições de cultura, o conteúdo e a composição de esteróis livres em *calli* não-morfogénicos, *calli* organogénicos e *calli* embriogénicos, bem como nos rebentos caulinares e embriões somáticos produzidos nos dois últimos tipos de *calli*, respectivamente. Verificou-se que existem diferenças significativas entre as diferentes estruturas, órgãos e tecidos, quer em termos de conteúdo específico da fracção esterólica total, quer nas proporções relativas dos principais constituintes. Ao fim de 8 semanas de cultura, os *calli* com capacidade morfogénica (organogénicos ou embriogénicos) apresentaram conteúdos esterólicos totais mais elevados que os não-morfogénicos, ao passo que os rebentos caulinares e os embriões somáticos apresentaram razões estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol não muito diferentes entre si mas significativamente mais elevadas que os *calli*. Ao longo do período de crescimento dos *calli* não-morfogénicos ocorreram variações importantes e consistentes nos níveis de  $\beta$ -sitosterol. Estas variações estavam relacionadas com as diferentes fases de crescimento sendo aparentemente independentes da suplementação hormonal do meio.

## Introdução

Não obstante a vasta informação adquirida sobre estratégias para a indução de organogénese e embriogénese somática, o conhecimento da biologia fundamental inerente a estes processos do desenvolvimento mantem-se diminuto. Vários estudos têm sido contudo realizados no sentido de conhecer a sequência dos eventos ontogénicos de modo a perceber os processos de indução e expressão da embriogénese somática (1) bem como da morfogénese em geral (2). As abordagens bioquímicas poderão contribuir, decisivamente, para a revelação de alguns dos processos fisiológicos e moleculares subjacentes à indução e expressão destes programas de desenvolvimento vegetal.

As membranas celulares, separando compartimentos diferentes mas ao mesmo tempo permitindo uma comunicação selectiva entre eles, deverão constituir um alvo privilegiado de controlo. As suas especificidades bioquímicas e estruturais irão traduzir-se em funcionalidades diferentes e estas, por sua vez, em alterações na comunicação intra e intercelular. Durante a diferenciação e o crescimento de tecidos e órgãos e o desenvolvimento das plantas, variações quantitativas e qualitativas importantes ocorrem nas membranas celulares. Em culturas *in vitro*, a suplementação hormonal tem um papel determinante na indução dos diferentes processos de diferenciação de tecidos e órgãos e portanto de regeneração das plantas-alvo. Não é portanto de excluir que a sua acção se manifeste também ao nível da composição das membranas celulares. Um rápido aumento na formação de lípidos polares, nomeadamente de fosfolípidos, no período imediatamente anterior ao aparecimento de embrióides foi já descrito (3 e referências inclusas) tendo sido correlacionado com o aumento da taxa de divisão celular que ocorre naquele período. Alterações lipídicas associadas com a indução de rebentos caulinares foram também descritas (2 e referências inclusas; 4, 5).

Tal como os fosfolípidos, os esteróis são, em primeiro lugar, componentes fundamentais das membranas celulares (6, 7). As membranas plasmáticas são as membranas celulares com maior conteúdo em esteróis, apresentando a razão esteróis/fosfolípidos mais elevada (8). Os esteróis desempenham ainda outros papéis importantes, não estruturais,

actuando designadamente como moléculas mediadoras de sinais extra- e intracelulares, de tipo hormonal. Este papel dos esteróis na comunicação intercelular, assume particular interesse no estudo dos mecanismos de indução *in vitro*. A produção de fitosteróis em culturas *in vitro* tem sido alvo de muitas publicações (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). No entanto, e apesar de se admitir que a composição esterólica das membranas pode estar sujeita a regulação espacial e pelo desenvolvimento vegetal, não foram encontrados estudos sobre síntese e acumulação de fitosteróis associados com a indução e expressão de organogénese e embriogénese somática *in vitro*.

Os esteróis podem definir-se como alcoóis secundários com 27 a 29 átomos de carbono (C), sólidos cristalinos à temperatura ambiente. Possuem tipicamente um sistema de 4 anéis (A, B, C e D) num arranjo denominado 1,2-ciclopentanofenantreno (fig. III.1) (6). Estes compostos são bastante ubíquos, tendo sido encontrados, em número considerável, em plantas, animais e fungos. Os principais esteróis encontrados em plantas e animais têm um grupo 3 $\beta$ -hidroxilo, grupos metilo em C-10 e C-13 e uma cadeia lateral com 8 a 10 átomos de carbono em C-17 (fig. III.1). As funções estruturais e hormonais referidas têm sido atribuídas apenas aos esteróis livres sem substituição em C-4 – os 4-demetilesteróis ou  $\Delta^5$ -esteróis (6). O esterois mais abundante nas plantas superiores é o  $\beta$ -sitosterol, sendo o campesterol e o estigmasterol também bastante comuns (fig. III.1). Todos estes fitosteróis pertencem ao grupo dos 4-demetilesteróis. A figura III.2 representa esquematicamente as posições relativas destes esteróis na respectiva sequência biossintética. A classificação e a biossíntese dos fitosteróis sai do âmbito deste trabalho, existindo abundante literatura sobre estes assuntos (6).

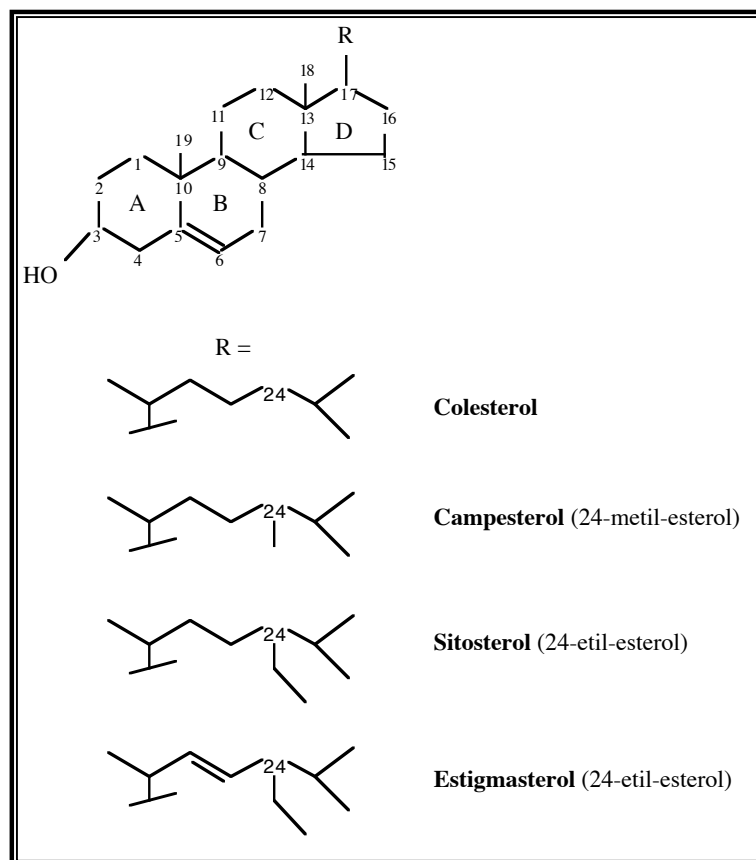


Figura III.1 – Estrutura de alguns fitosteróis. Adaptado de Grunwald 1975 (6).

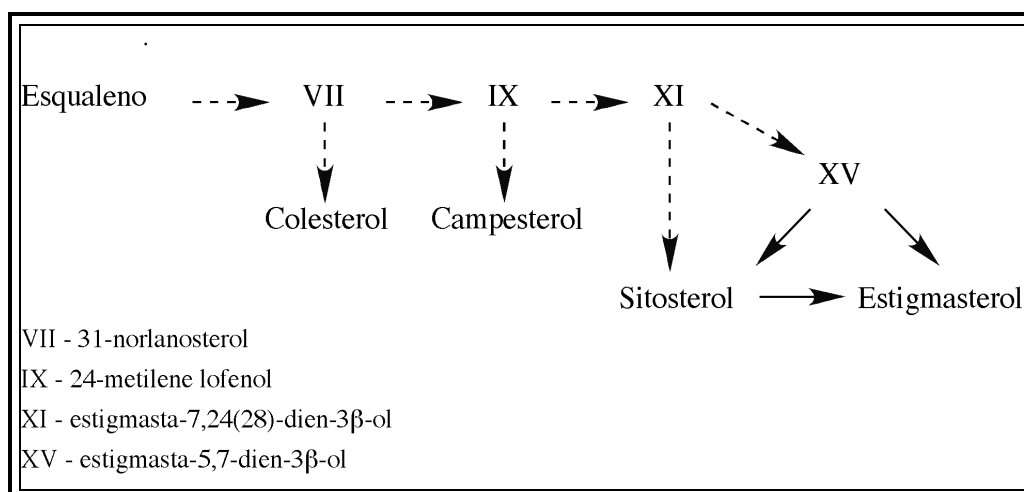


Figura III.2 – Esquema resumido da via biossintética dos esteróis. As setas a cheio representam transformação directa enquanto que as setas a tracejado significam que passos intermédios foram omitidos. Adaptado de Grunwald 1975 (6).

Nas plantas superiores, os esteróis têm um importante papel na arquitectura e função das membranas celulares basicamente através do seu efeito estabilizador dos fosfolípidos (fig. III.3). As configurações moleculares planas são necessárias para a interacção com as cadeias alifáticas daqueles compostos, sendo que apenas os esteróis livres penetram no seu interior (18). O aumento da rigidez da bicamada lipídica, por acção dos esteróis, envolve a diminuição da permeabilidade da membrana e está relacionada com o tamanho e configuração espacial destas moléculas (18). A capacidade para diminuir a fluidez e a permeabilidade da membrana varia de acordo com a seguinte sequência – colesterol > campesterol >  $\beta$ -sitosterol > estigmasterol (18). Muitos fenómenos de difusão, dependentes da permeabilidade das membranas, são ainda regulados por esteróis livres, pela interacção com esteróis de membrana ou pela alteração das interacções esterol/fosfolípido (6). A actividade de certas enzimas ligadas a membranas, como a  $H^+$ -ATPase (19), depende também da fluidez das membranas e portanto é afectada pela composição esterólica das mesmas. A composição relativa dos esteróis dos vários organelos intracelulares é diferenciada, indicando que a composição específica destes compostos poderá estar associada às diferentes funções que tais organelos desempenham (6). A diferente composição em esteróis das membranas celulares, associada por um lado ao carácter conservativo dos esteróis em plantas e fungos e, por outro, às diferentes funcionalidades/propriedades das membranas, tem sido explorada respectivamente, como ferramenta taxonómica (14, 20, 21) e como marcador químico dos diferentes órgãos vegetais (22).

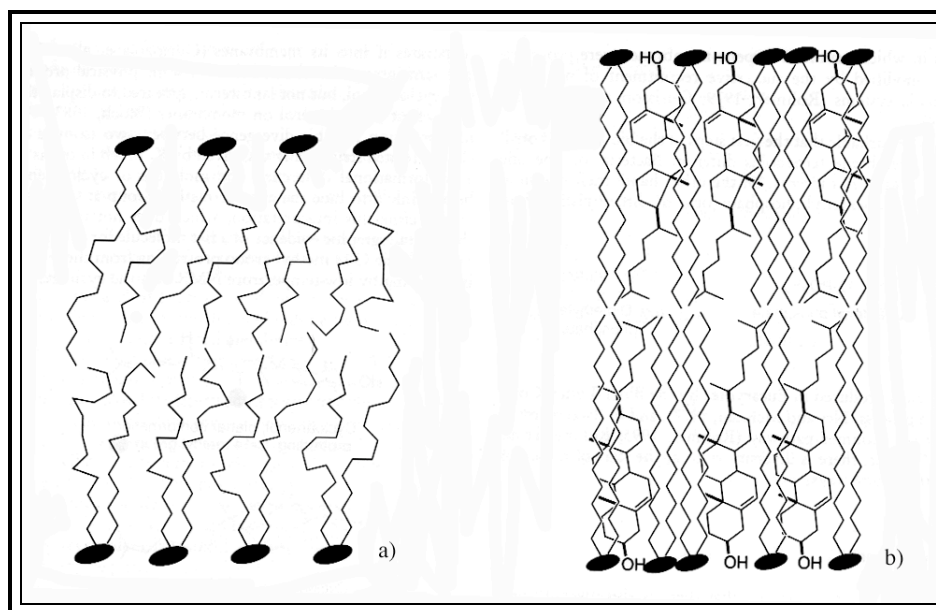


Figura III.3 – Esquema ilustrando o efeito da presença de colesterol em membranas fosfolipídicas: a) membrana sem colesterol, desordenada e fina; b) membrana rica em colesterol, ordenada, mais espessa e condensada. Adaptado de Ourisson 1994 (17).

A função de tipo hormonal atribuída a alguns esteróis, pode estar directa ou indirectamente relacionada com a sua utilização como precursores de esteróides hormonais (6). Esta hipótese tem sido colocada para explicar a interferência de esteróis em vários resultados experimentais relacionados com o crescimento e fases do desenvolvimento vegetal (germinação, floração, senescência, etc) (6). Admite-se também que, muitos dos processos regulados por esteróis *in vitro* possam estar relacionados com a intervenção destes compostos no metabolismo de reguladores do crescimento do tipo giberelinas e auxinas (6).

Vários outros papéis de tipo não-estrutural têm sido atribuídos, embora com menor ênfase, a fitosteróis livres, nomeadamente o de poderem actuar como agentes antivirais (23). Mais recentemente, a descoberta de 2 genes (*SMT1* e *FK*) relacionados com a biossíntese destes compostos em *Arabidopsis thaliana* revelou, pela primeira vez, que os esteróis podem estar associados à embriogénese das plantas (24). A observação de que os embriões mutantes *smt1* e *fk* apresentavam alterações no padrão de desenvolvimento apical-basal e radial e que, a expressão destes genes não se encontrava associada a locais de biogénese de membranas (25), levou a especular sobre o papel dos esteróis como moléculas-sinal, não-hormonais, necessárias para uma morfogénese correcta a partir do estágio de embrião globular.

As informações existentes sobre o importante papel dos esteróis no desenvolvimento das plantas conduziram ao estudo aqui descrito. O seu objectivo central consistiu:

- na determinação dos **perfis esterólicos** dos diferentes tipos de culturas de *Linum usitatissimum* induzidas *in vitro*;
- na determinação das relações entre os padrões de variação do **conteúdo e composição** em esteróis livres e o **crescimento e capacidades morfológicas** de *calli*; e eventualmente
- a determinação do **valor diagnóstico** dos esteróis identificados na caracterização dos diferentes tipos de tecidos e dos diferentes processos de regeneração.

Para a consecução destes objectivos foram desenvolvidas 3 experiências que envolveram:

- o estudo comparativo de diferentes tipos de **estruturas, órgãos e tecidos** de linho, tais como sementes, plântulas germinadas *in vitro* e *calli*, rebentos caulinares e embriões somáticos induzidos a partir de explantes sub-cotiledonares (SH);
- o estudo comparativo de *calli* com diferentes **capacidades morfológicas**; e
- o estudo temporal ao longo dos ciclos de **crescimento** de *calli* **não-morfológicos** em meios com diferentes **suplementações hormonais**.



## Material e Métodos

### 1 – Material vegetal e condições de cultura

Sementes de linho foram esterilizadas, inoculadas em meio MS0 e mantidas em condições controladas tal como descrito na secção de M&M do capítulo anterior. Consoante o ensaio em questão o período de germinação foi de 3 a 5 semanas. Todo o material biológico utilizado nos ensaios realizados foi mantido no regime térmico e de fotoperíodo descritos na Tabela II.1.

#### 1.1 – Meios de germinação

As sementes de linho foram cultivadas em meio basal MS (26), tendo-se testado 3 variantes hormonais (Tabela III.1) no sentido de estudar o efeito da adição de fito-reguladores na germinação de sementes de linho e no desenvolvimento das plântulas, bem como nos respectivos teores e perfis de esteróis livres. Deste modo, foi também possível inferir sobre a qualidade dos explantes primários.

Tabela III.1 – Combinações hormonais do meio basal MS (26) (MS0, MS2 e MS3) utilizadas na avaliação do efeito da adição de auxinas e citocininas na germinação e desenvolvimento de plântulas de linho e respectivos perfis esterólicos.

Meio de germinação	Combinação hormonal (auxina + citocinina)	Concentração hormonal (mg/l)
MS0	-	-
MS2	IBA + KIN	0,6 + 0,5
MS3	2,4-D + ZEA	0,5 + 0,5

Nota: os pesos moleculares dos fito-reguladores encontram-se na Tabela II.2.

### *1.2 – Meio de indução morfogénica e material amostrado*

Um ou dois segmentos de hipocótilo (segmentos *a* e *b*, fig. II.6 do capítulo anterior) foram excisados de plântulas com 3 a 5 semanas germinadas em meio MS0 e usados como explantes primários. Estes segmentos foram inoculados em meio MS suplementado com **0,4 mg/l de 2,4-D + 1,6 mg/l de ZEA (MS5)**, suplementação esta que, como se verificou no capítulo anterior, proporciona elevada eficiência embriogénica (27). Porque este meio tem a particularidade de co-induzir embriogénese somática e caulogénese indirectas, a par do desenvolvimento de *calli* não-morfogénicos, é possível, num mesmo ambiente hormonal, estudar diferentes tipos de tecidos/estruturas vegetais. Ao fim de 8 semanas de cultura – atingida a fase estacionária dos *calli* e também níveis máximos de indução morfogénica (como se viu no capítulo anterior) – 5 tipos de tecidos ou estruturas foram amostrados: *calli* não-morfogénicos (**CNE**), *calli* caulogénicos (**CC**), *calli* embriogénicos (**CE**) e respectivos rebentos caulinares (**RC**) e embriões somáticos em fase cotiledonar e pós-cotiledonar (**ES**), estruturas estas que foram destacados dos respectivos *calli* com o auxílio duma pinça. Os *calli* que apresentassem conjuntamente ES e RC não foram incluídos na amostragem. Fizeram-se 2 a 3 replicados compostos por amostra, ou seja, cada replicado era constituído por várias culturas colhidas aleatoriamente. Todos os tecidos e estruturas foram conservados separadamente a -70 °C para posterior análise de esteróis.

### *1.3 – Meios de indução de calli não-morfogénicos e métodos de amostragem ao longo do tempo*

Para estudar a variação temporal dos esteróis livres durante as fases de crescimento de *calli* não-morfogénicos, i.e, não comprometidos com qualquer via de diferenciação de tecidos, foram testadas duas combinações hormonais em meio MS base: 0,5 mg/l de 2,4-D + 0,25 mg/l de ZEA (**MS3**) e 0,6 mg/l de IBA + 0,25 mg/l de ZEA (**MS4**). De modo a garantir a natureza não-morfogénica dos *calli*, estes foram sub-cultivados, com intervalos de 5-6 semanas, para meio fresco e mantidos nas mesmas condições ambientais durante 5 meses, antes do início desta experiência. A amostragem foi realizada como descrito na secção de M&M do capítulo anterior. Os *calli* amostrados foram processados posteriormente como descrito em 1.2.

## 2 – Estudo da fracção esterólica do extracto lipídico

### 2.1 – Extracção dos lípidos totais

O material vegetal das amostragens realizadas em todos os ensaios descritos anteriormente foi liofilizado durante 48 h a 4  $\mu$ bar, pesado e pulverizado em almofariz antes de se proceder à extracção dos lípidos totais. A quantidade de biomassa utilizada neste processo esteve dependente do material vegetal disponível e, portanto, variou com o tipo de amostra em questão (Tabela III.2). As fracções lipídicas foram obtidas por extracção com *n*-hexano em aparelho de Soxhlet durante 48 h. Cada uma das soluções em *n*-hexano, contendo os extractos lipídicos totais, foi lavada com 100 ml de água destilada e de seguida, desidratadas em sulfato de sódio anidro e filtradas em papel Whatman nº1 antes serem sujeitas à evaporação do solvente. O solvente *n*-hexano, de cada extracto, foi removido num evaporador rotativo tipo Büchi sob pressão reduzida até um volume de poucos mililitros. Este era posteriormente transferido para um frasco de derivatização de 5 ml e submetido a fluxo de azoto para evaporação completa do solvente, à temperatura ambiente, até se obter peso constante do extracto lipídico. Os extractos lipídicos assim obtidos eram então pesados em balança analítica (H54AR, Mettler), redissolvidos em 4 ml de *n*-hexano e conservados no escuro a 4 °C.

Tabela III.2 – Diferentes tipos de material vegetal amostrados e processados nos diferentes ensaios e biomassa utilizada, por replicado, para extracção de lípidos e estudo dos esteróis.

Tipo de material vegetal	Biomassa utilizada para extracção (mg)
Sementes	3000
Plântulas	300 - 450
<i>Calli</i> (CNE*, CC e CE)	200 - 300
Embriões somáticos (ES) e rebentos caulinares (RC)	50 - 70

\* com excepção do ensaio sobre crescimento de *calli* não-morfogénico onde a biomassa das amostras (de 8 *calli* cada) oscilou entre 100 e 800 mg.

## *2.2 – Derivatização da fracção lipídica e análise da fracção esterólica*

A análise dos esteróis presentes na fracção lipídica foi realizada por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) tendo-se procedido à derivatização prévia dos extractos lipídicos pelo método de sililação. Os éteres trimetilsilil dos esteróis assim obtidos, foram identificados por comparação com os padrões campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (ver nomenclatura) e quantificados pelo método do padrão interno (p.i.). Como p.i. utilizou-se o colesterol em solução de tetrahydrofurano (THF, MERCK) após se ter confirmado que estava ausente nos extractos. Todos os padrões utilizados tinham um grau de pureza superior a 99 % (SIGMA, Barcelona).

A sililação dos esteróis livres foi efectuada segundo metodologia adaptada de Fernandes-Ferreira (28). Volumes conhecidos de solução *n*-hexano de extracto lipídico concentrado (contendo 1-6 mg de massa de extracto seco) foram colocados em frascos de derivatização e submetidos a fluxo de N<sub>2</sub> até evaporação do solvente. Os extractos foram então retomados por dissolução em 100  $\mu$ l da solução de p.i. em tetrahydrofurano contendo 0,1 mg de colesterol, após o que se adicionou 50  $\mu$ l de hexametildissilano (HMDS, MERCK) e 5  $\mu$ l de trimetilclorossilano (TMCS, FLUKA). A mistura de derivatização foi deixada a reagir durante 1 h a 55 °C e depois durante a noite à temperatura ambiente. Por cada replicado foram realizadas, pelo menos, 3 análises em GC. A identificação dos esteróis foi confirmada por co-cromatografia com derivados sililados dos padrões campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol e por análise espectral por GC-MS. As características das colunas utilizadas e as condições operacionais de análise encontram-se descritas na Tabela III.3.

Tabela III.3 – Descrição das características das colunas utilizadas e das condições operacionais de análise em GC e GC-MS dos éteres trimetilsilil de esteróis obtidos por silição do extracto lipídico total.

GC	Perkin Elmer 8600 com injector split-splitless a 300 °C, detector FID a 320 °C, coluna BP5 (J&W Scientific) 25 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme (5 % de fenil dimetilsiloxano)
GC-MS	Perkin Elmer 8500 com injector split-splitless a 300 °C, coluna DB5 (J&W Scientific) 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme (5 % de fenil dimetilsiloxano) – detector de captura de iões (Finnigan MAT) operando em modo EI a 70 eV
Programa térmico, gases e pressão na coluna	180 °C – 280 °C (5 °C/min) seguido de isotérmica 15 min H <sub>2</sub> e He <sub>2</sub> como gases de arraste em GC e GC-MS respectivamente, a uma pressão de 12,0 PSI

FID – detector de ionização de chama

ID – diâmetro interno

EI – Impacto electrónico

Assumindo que o factor de resposta ( $FR = (MC_i/AC_i) \times (AP/MP)$ ) dos esteróis presentes na amostra em relação ao padrão interno é igual a um, devido à natureza química e dimensão das moléculas ser semelhante, a quantificação dos derivados sililados foi feita utilizando o software do GC seleccionando o modo de quantificação “método do padrão interno” que utiliza como algoritmo:

$$(MC_i/AC_i) = (MP/AP) \quad \text{onde M e A representam respectivamente a massa e a área integrada do pico do composto i (C}_i\text{) ou do padrão (P).}$$

Nomenclatura química – Campesterol = (24R)-24-metil-colesta-5-en-3β-ol; β-sitosterol = (24R)-24-etil-colesta-5-en-3β-ol; estigmasterol = (24R)-24-etil-5α-colesta 5,22-dien-3β-ol.

### 3 – Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA. Comparações *post-hoc* foram realizadas com o teste HSD Tukey (Statistica@4.1 da StatSoft, Inc). As análises de regressão não-linear foram realizadas com o pacote Data Analysis do KaleidaGraph 3.0.2 (Abelbeck Software).

## Resultados

### *1 – Lípidos totais e esteróis livres em sementes e diferentes tecidos e órgãos de linho regenerados in vitro*

Os conteúdos específicos de lípidos totais e de esteróis livres determinados em diferentes tecidos e órgãos de linho encontram-se representados na Tabela III.4. Embora as sementes tenham revelado o conteúdo específico de lípidos totais mais elevado, *ca.* de 5 vezes os das plântulas, caules e embriões somáticos e 10 vezes o dos *calli*, o mesmo não aconteceu quanto ao dos esteróis livres totais o qual foi menor do que em qualquer dos outros tecidos ou órgãos, à excepção dos *calli* não-morfogénicos onde o teor destes compostos não foi significativamente diferente do das sementes (Tabela III.4). Os valores mais elevados de esteróis livres foram encontrados em plântulas, especialmente nas germinadas em meio MS0, e nos rebentos caulinares (RC) e embriões somáticos (ES) diferenciados a partir dos respectivos *calli* (CC e CE). Estes resultados estão de acordo com a observação de que durante a germinação de sementes ocorre um aumento nos esteróis livres (6). Em estudos realizados com *Zea mays* verificou-se que, apesar das sementes não produzirem esteróis *de novo* podem fornecer 70 % de esteróis para o crescimento inicial de plântulas, ocorrendo posteriormente, até ao 8º dia de germinação, síntese activa de esteróis nas raízes e caules, paralelamente ao crescimento das plântulas (16). Os *calli* apresentaram valores intermédios, sendo o valor obtido para os *calli* não-morfogénicos, no entanto, significativamente inferior aos obtidos para os *calli* com capacidade morfogénica (CC e CE) (Tabela III.4). Estes resultados quantitativos aproximam-se bastante dos obtidos em culturas semelhantes de outras espécies (14) onde se verificaram conteúdos específicos de esteróis livres de 2,3 a 3,17  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomassa. Relativamente aos lípidos totais, os valores mínimos foram registados nos *calli*, *ca.* de 2-3 vezes menores que os das plântulas, caules e embriões somáticos. Por outro lado, contrariamente ao que se tinha observado com os esteróis, os *calli* embriogénicos apresentaram um conteúdo de extracto lipídico total

significativamente inferior ao dos *calli* não-morfogénicos (Tabela III.4). Este resultado leva a admitir que haja menor acumulação de alguns lípidos nos *calli* embriogénicos ou mobilização de reservas lipídicas a partir destes para o desenvolvimento dos embriões somáticos emergentes.

No que diz respeito à influência da suplementação hormonal no meio de germinação de sementes de linho, verificou-se que este factor causou perturbações nas plântulas desenvolvidas a dois níveis diferentes: ao nível do padrão do seu desenvolvimento morfológico normal (dados não mostrados) e ao nível da acumulação de lípidos e de esteróis livres totais (Tabela III.4). A germinação de sementes em meios com suplementação hormonal conduziu ao desenvolvimento de plântulas com caules e raízes mais curtos e grossos e algo tuberizados comparativamente às plântulas desenvolvidas em meio sem suplementação (MS0). O meio MS3 foi o que induziu maior acumulação de lípidos totais e menor acumulação de esteróis nas plântulas (Tabela III.4) e também aquele que mais afectou o padrão de desenvolvimento das plântulas.

Tabela III.4 – Conteúdos específicos de lípidos totais e de esteróis livres em sementes, plântulas, órgãos e tecidos de linho desenvolvidos *in vitro*. As plântulas e os *calli* foram mantidos em meio base MS com diferentes suplementações hormonais. Os resultados representam valores médios de 2 ou 3 replicados. Em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

Material vegetal	Suplementação hormonal do meio MS (mg/l)	Lípidos totais (mg/g biomassa)	Esteróis livres (mg/g biomassa)
Sementes secas	-	352,8 a	0,94 d
Plântulas	0 (MS0)	65,3 bc	2,24 a
	0,6 IBA + 0,5 KIN (MS2)	62,8 c	1,88 ab
	0,5 2,4-D + 0,25 ZEA (MS3)	93,4 b	1,83 b
Calli não-morfogénicos (CNE)		28,1 d	1,32 d
Calli caulogénicos (CC)		32,3 de	1,48 c
Calli embriogénicos (CE)	0,4 2,4-D + 1,6 ZEA (MS5)	23,6 e	1,45 c
Rebentos caulinares (RC)		62,1 c	2,13 a
Embriões somáticos (ES)		61,5 *	2,1 *

\* Não incluído na análise estatística por ser o resultado de uma observação apenas (perdeu-se o duplicado). O valor situa-se, no entanto, na gama de valores obtidos para os embriões somáticos e plântulas germinadas *in vitro*.

## 2 – Composição e proporções relativas de esteróis livres em sementes e em plântulas, órgãos e tecidos de linho desenvolvidos *in vitro*

A análise cromatográfica dos extractos lipídicos revelou que, tal como ocorre na maioria das espécies, os esteróis maioritários presentes nos tecidos e estruturas examinadas são os 4-demetilesteróis: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. A figura III.4 mostra cromatogramas exemplificativos de alguns perfis esterólicos de amostras diferentes.





A proporção de  $\beta$ -sitosterol mais elevada foi registada nas sementes e a mais baixa em plântulas provenientes de germinação *in vitro* (figs. III.5 e III.6). Em ambas as situações os teores de campesterol foram significativamente superiores aos do estigmasterol (fig. III.5). Durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas *in vitro*, a síntese e acumulação de campesterol e estigmasterol aumentaram a taxas muito superiores às do  $\beta$ -sitosterol, independentemente da suplementação hormonal do meio de germinação. A razão estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol nas plântulas foi *ca.* de 5x superior à das sementes e a de campesterol/ $\beta$ -sitosterol 2x superior (fig. III.5). Este aumento diferencial de campesterol e principalmente de estigmasterol nas plântulas relativamente às sementes parece traduzir uma maior actividade de biossíntese de estigmasterol directamente a partir do  $\beta$ -sitosterol (fig. III.2), provavelmente associada à diferenciação de membranas durante o desenvolvimento. Existem contudo evidências experimentais de que este padrão de acumulação de esteróis durante a germinação não será universal. De facto, enquanto que em *Nicotiana tabacum* o estigmasterol foi o responsável pela maior parte do aumento do conteúdo esterólico total, em *Brassica napus* e em *Sinapsis alba* foi o  $\beta$ -sitosterol (6).

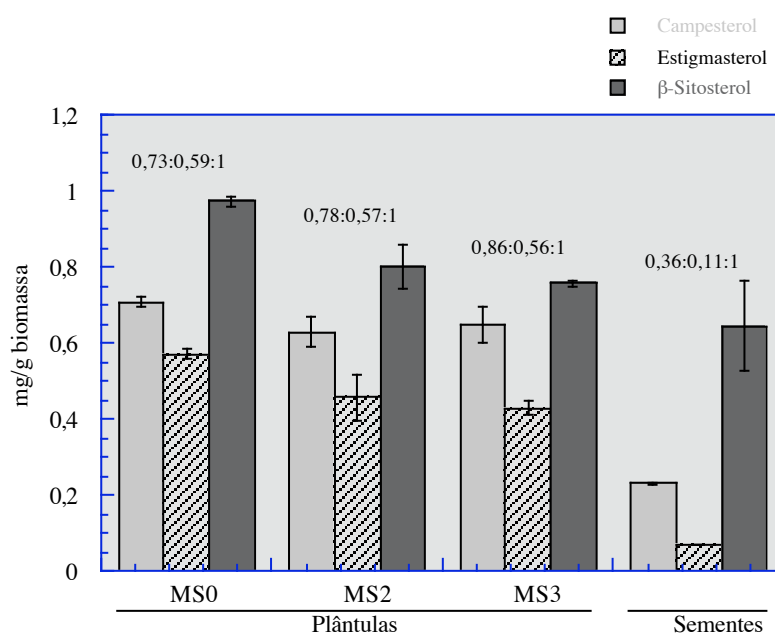


Figura III.5 – Conteúdos específicos dos principais esteróis de sementes e de plântulas de linho obtidas por germinação das sementes *in vitro* em meio MS0, MS2 e MS3 (ver Tabela III.4). Os resultados são médias de 3 replicados e as barras de erro correspondem a  $\pm$ SE. As proporções campesterol:estigmasterol:sitosterol encontram-se no topo de cada amostra.

Os *calli*, independentemente das suas capacidades morfogénicas, revelaram uma distribuição relativa dos 3 esteróis análoga à observada nas plântulas, com uma relação campesterol/estigmasterol semelhante, mas com um teor de  $\beta$ -sitosterol proporcionalmente maior (fig. III.6). Dado que os *calli* submetidos a extracção se encontravam em fase estacionária (8 semanas de cultura), a taxa de produção de membranas seria, nessa altura, bastante baixa.

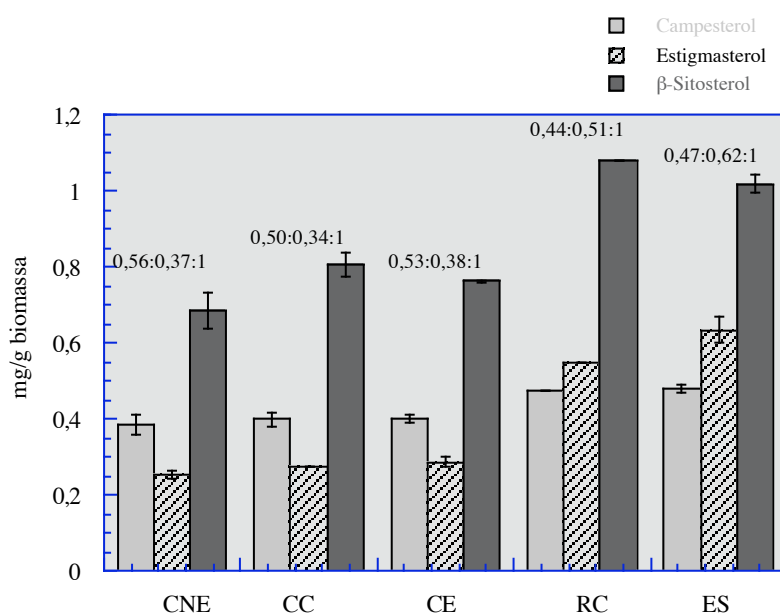


Figura III.6 – Conteúdos específicos dos principais esteróis presentes em *calli* não-morfogénicos (CNE), *calli* organogénicos (CC), *calli* embriogénicos (CE), rebentos caulinares (RC) e embriões somáticos (ES) induzidos em meio MS5 (0,4 mg/l 2,4-D + 1,6 mg/l ZEA). Os resultados são médias de 2-3 replicados e as barras de erro correspondem a  $\pm$ SE. As proporções campesterol:estigmasterol:sitosterol encontram-se no topo de cada amostra.

Os rebentos caulinares e os embriões somáticos revelaram uma distribuição esterólica relativa diferente da registada em sementes, plântulas e *calli*, apresentando teores de campesterol mais baixos que os de stigmasterol (fig. III.6). A proporção de campesterol relativamente a  $\beta$ -sitosterol, nestas estruturas, foi próxima da dos *calli*, mas muito menor que a registada em plântulas. À semelhança do que se observou durante a germinação, em que houve um aumento substancial na proporção de stigmasterol na passagem de semente a plântula, a acumulação de stigmasterol em RC e ES foi também mais elevada que a observada nos *calli* de que derivaram (fig. III.5 e III.6). Um valor elevado de  $\beta$ -sitosterol e de stigmasterol paralelamente a um valor relativamente

baixo de campesterol parece indicar que, nestes tecidos, há uma maior actividade de síntese daqueles esteróis em detrimento da via que conduz à síntese de campesterol (fig. III.2). Apoiando de certo modo estes resultados, verificou-se que, em diferentes espécies vegetais, as folhas de plantas regeneradas a partir de *callus*, onde o  $\beta$ -sitosterol era o esterol maioritário (55 %), apresentaram contudo uma maior proporção de estigmasterol (14). Outra explicação plausível vem do conhecimento de estudos cinéticos (16) que mostraram que, durante as primeiras fases de desenvolvimento das plântulas, o carbono flui preferencialmente para a formação de  $\beta$ -sitosterol e em seguida, para a produção de 24-metil-esteróis (campesterol). Esta alteração poderá explicar os valores proporcionalmente mais elevados de campesterol obtidos em *calli* na fase estacionária e em plântulas com *ca.* de 3-5 semanas de germinação relativamente aos rebentos e embriões somáticos (figs. III.5 e III.6). Globalmente, estes resultados parecem indicar que, a proporção de estigmasterol livre nos tecidos poderá constituir um indicador da diferenciação de membranas plasmáticas, como ocorre na germinação e na regeneração morfogénica a partir de *calli*. Por outro lado, valores elevados de esteróis livres, mas principalmente de  $\beta$ -sitosterol (figs. III.5 e III.6), parecem ser necessários para um desenvolvimento normal de tecidos diferenciados.

### *3 – Evolução dos conteúdos específicos de esteróis livres durante o crescimento de calli não-morfogénicos: efeito de diferentes suplementações hormonais*

*Calli* não-morfogénicos quando transferidos para os meios MS3 e MS4 apresentaram perfis de crescimento diferentes, como foi referido no capítulo anterior. Em presença de 0,5 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l de ZEA (MS3) a função que melhor descreveu o crescimento dos *calli* foi uma curva do tipo sigmoidal com uma fase exponencial visível (fig. III.7a). Em meio MS suplementado com 0,6 mg/l IBA + 0,25 mg/l de ZEA (MS4), apesar da taxa de crescimento dos *calli* ter sido praticamente constante durante o mesmo período, foi possível distinguir um crescimento bifásico, mais activo nas primeiras 3 semanas que nas seguintes (fig. III.7b). A variação ocorrida no teor de esteróis livres ao longo do período de crescimento foi também diferente nos *calli* crescidos nos 2 meios testados. Nos *calli* desenvolvidos em meio MS4 foram observadas variações nos esteróis livres que acompanharam a curva de crescimento bifásico: um aumento na fase

mais activa de crescimento e uma diminuição na fase com menor taxa de crescimento (fig. III.7b). Nos *calli* desenvolvidos em meio MS3, essa tendência foi verificada apenas com o  $\beta$ -sitosterol, cujo teor, dum modo análogo, aumentou até ao fim da fase exponencial e linear de crescimento, diminuindo, posteriormente, na fase de menor crescimento (fig. III.7a). No que respeita ao campesterol e estigmasterol não se observou qualquer variação coerente ao longo do crescimento neste meio de cultura. No entanto, o teor de  $\beta$ -sitosterol foi bastante mais elevado que o registado nos *calli* mantidos em meio MS4, ao passo que, o nível de campesterol foi globalmente mais baixo (figs. III.7a e III.7b).

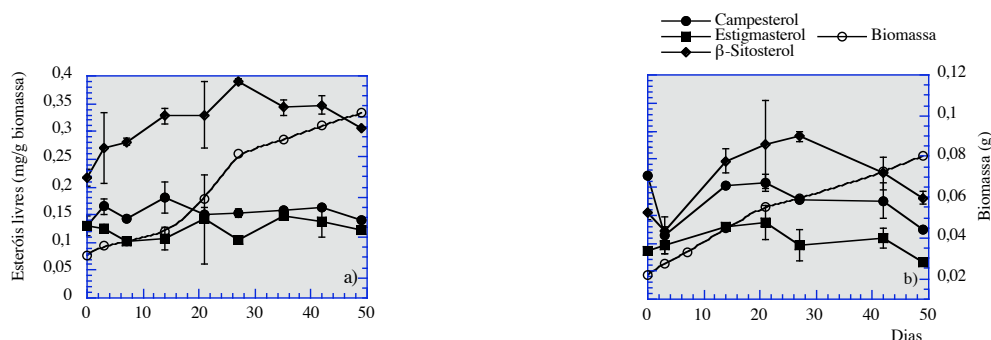


Figura III.7 – Perfis de crescimento e de acumulação de esteróis livres de *calli* de linho mantidos em meio MS suplementado com 0,5 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l ZEA (MS3) (Fig. 7.IIIa) e em meio com 0,6 mg/l IBA + 0,25 mg/l ZEA (MS4) (Fig.III.7b). Os resultados são médias de 2 a 3 replicados e as barras de erro correspondem a  $\pm$ SE.

Em estudos efectuados noutras espécies verificou-se que tecidos jovens em crescimento activo apresentavam igualmente uma razão  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol mais elevada, razão essa que diminuía à medida que o tecido envelhecia (18). Em tecidos de cultura *in vitro* de *Zea mays* observou-se o mesmo padrão de variação daquela razão durante o crescimento e envelhecimento fisiológico dos tecidos, tendo ocorrido maior produção de 24-etil-esteróis, com predominância do  $\beta$ -sitosterol, durante a fase de crescimento activo (16). Os resultados obtidos neste trabalho, com culturas de linho, parecem também evidenciar uma relação estreita entre o crescimento activo dos *calli* e os respectivos teores de  $\beta$ -sitosterol livre. De facto, ao representar-se o teor de  $\beta$ -sitosterol em função da biomassa dos *calli* (que por sua vez está directamente relacionada com o tempo de cultura), foi possível descrever aquela relação segundo uma função parabólica (fig. III.8). Pela observação desta figura pode constatar-se claramente que, os teores

máximos foram obtidos no final da fase mais activa de crescimento dos *calli* mantidos em qualquer das suplementações, sendo que o meio MS3 foi mais eficiente no crescimento dos *calli* e, paralelamente, na acumulação de  $\beta$ -sitosterol, do que o meio MS4. Sabendo que estes meios de cultura diferem apenas no tipo de suplementação auxínica, é possível especular quanto ao papel das auxinas, nomeadamente do 2,4-D, no metabolismo dos esteróis e, eventualmente, na acumulação acrescida destes compostos em associação ao maior crescimento dos *calli* promovido por este tipo de fito-regulador.

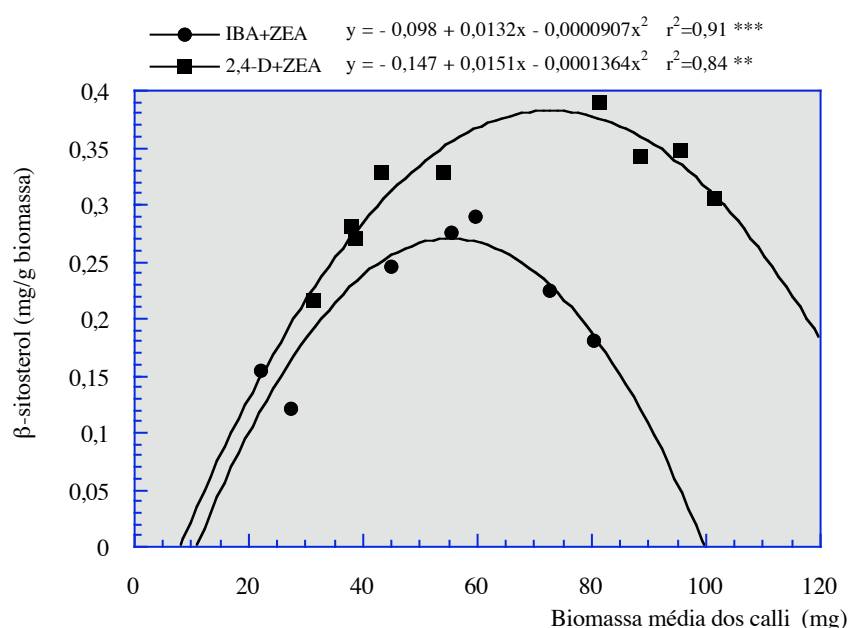


Figura III.8 – Conteúdo específico em  $\beta$ -sitosterol em função da biomassa média dos *calli* colhidos ao longo do período de crescimento em MS3 (2,4-D+ZEA) e MS4 (IBA + ZEA). As equações das funções quadráticas, os respectivos  $r^2$  e níveis de significância encontram-se representados para cada suplementação hormonal.

Os resultados obtidos na germinação de sementes sob diferentes regimes de suplementação hormonal parecem, contudo, contraditórios com esta ideia. A presença de fito-reguladores no meio de germinação traduziu-se numa menor produção de esteróis, especialmente  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol que são os mais associados ao crescimento e diferenciação de membranas, respectivamente (fig. III.5). Provavelmente, em sistemas auto-suficientes, com programas internos que asseguram o normal desenvolvimento na ausência de fito-reguladores exógenos, como é o caso de sementes, a adição de auxinas poderá induzir alterações no padrão de desenvolvimento

acompanhada por diminuição nos teores de esteróis livres. Como já foi referido, as plântulas obtidas por germinação de sementes nestes meios, e especialmente no meio suplementado com 2,4-D, apresentaram um desenvolvimento morfológico anormal resultando em plantas com menores dimensões relativamente ao eixo apical-basal.

## Discussão

O menor conteúdo de lípidos totais observado em *calli* embriogénicos relativamente ao de *calli* não-embriogénicos sugere que haverá um declínio do teor de lípidos totais nos tecidos embriogénicos como consequência da emergência e da maturação de embriões somáticos. Mhaske e Hazra (29) verificaram que a embriogénese somática em *Arachis hypogaeae*, induzida a partir de folhas imaturas, era igualmente precedida dum declínio de lípidos, nomeadamente de triglicerídeos, o qual continuava durante 4 semanas, após o que, estes compostos começavam a aumentar nos embriões emergentes. O ensaio não permitiu uma estatística suficientemente potente para distinguir uma eventual diferença entre *calli* caulogénicos e *calli* embriogénicos, no que diz respeito ao teor de lípidos totais (ver Tabela III.4), daí nada se poder inferir sobre a variação dos lípidos na indução e desenvolvimento de rebentos caulinares por organogénese.

A biossíntese de fitosteróis, tal como a de fosfolípidos, é necessária para a biogénese de membranas. Segundo Turnham e Northcote (3) a formação de lípidos polares aumenta durante a embriogénese de *Elaeis guineensis* no período que precede o aparecimento dos embrióides somáticos. De acordo com estes autores, concomitantemente ao aparecimento destes embrióides ocorre um incremento na taxa de divisão celular, podendo o aumento da produção de lípidos polares reflectir o aumento na biossíntese de fosfolípidos de membranas. A maior acumulação de esteróis livres em *calli* morfogénicos (CC ou CE) relativamente aos não-morfogénicos (CNE) poderá igualmente traduzir uma maior taxa de biogénese de membranas, associada à formação de rebentos caulinares e embriões somáticos. À luz de descobertas recentes sobre a função dos esteróis como moléculas-sinal associadas à embriogénese (24), é possível ainda atribuir àquele aumento diferencial de esteróis livres um papel na indução de diferenciação morfogénica.

A forma como o crescimento das plântulas germinadas em meio com suplementação hormonal (MS2 e MS3) foi negativamente afectado, principalmente as do meio MS3, veio de certo modo corroborar a ideia duma relação entre crescimento celular (*senso*



*lato*) e biossíntese de esteróis. Os teores de esteróis mais baixos foram obtidos precisamente nas plântulas desenvolvidas em MS3. O facto das plântulas jovens de linho, obtidas quer por germinação de sementes, quer por regeneração organogénica ou embriogénica a partir de *calli*, terem apresentado teores de esteróis mais elevados que as respectivas sementes e *calli* de que provieram (Tabela III.4), estará correlacionado com a maior actividade de biossíntese de esteróis para biogénese de membranas já que, de acordo com vários autores, os locais mais activos para a síntese destes compostos se encontram nos tecidos em diferenciação (6, 7, 18, 30). Este tipo de relação foi igualmente observada noutras espécies (6, 7, 16, 31).

Segundo alguns autores (32), embora a taxa de germinação de sementes de amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) não seja afectada pela presença de TDZ (uma auxina sintética) no meio de cultura, as plântulas resultantes apresentam sistemas radiculares truncados e mais grossos, e cotilédones hipertrofiados. Estas alterações no hábito de crescimento das plântulas, em presença de TDZ, foram explicadas pela existência de um desequilíbrio metabólico grave (33), ao qual estava associado um aumento do nível de ácidos gordos livres (34). No caso das plântulas de linho, resultantes da germinação de sementes sob o efeito de fito-reguladores exógenos (MS2 e especialmente MS3), os hipocótilos e raízes excessivamente curtos e algo tuberizados, bem como os baixos teores específicos de esteróis, são provavelmente o resultado da toxicidade dos níveis de auxina e citocinina utilizados. Um efeito tóxico devido a níveis supra-óptimos ou a interacções antagonistas de auxinas e citocininas, na produção de esteróis, foi descrito para outras espécies (10, 31, 35). Não se conhece contudo a relação causal que explica esta observação, i.e., se o efeito dos reguladores se faz sentir no crescimento/morfogénese e na biossíntese de esteróis de modo independente; se se faz sentir no crescimento através duma redução de actividade biossintética; ou se, de algum modo, o comprometimento do normal crescimento/morfogénese interfere com o requerimento em constituintes lipídicos de membranas e, portanto, na biossíntese de esteróis. Existem, contudo, evidências de que as auxinas no meio estimulam a biossíntese de fosfolípidos e esteróis, nomeadamente de  $\beta$ -sitosterol, de modo a fazer face à expansão e crescimento celulares, sendo que o crescimento induzido pela auxina é fortemente afectado por inibidores da síntese de lípidos das membranas (36). Deste modo, torna-se mais plausível que haja um efeito directo da auxina na biossíntese de

esteróis e fosfolípidos, que um efeito indirecto via crescimento. Corroborando esta ideia, várias enzimas envolvidas no metabolismo dos lípidos foram descritas como dependentes de auxina (36). Dados recentes, têm confirmado que alterações na morfogénese de embriões globulares, traduzidas na formação de plântulas com hipocótilos e raízes de tamanho reduzido, podem ser devidas a mutações em genes associados à síntese de esteróis (24). Tal constatação leva a admitir que as aberrações semelhantes observadas nas plântulas de linho obtidas em meios suplementados com hormonas, sejam provavelmente resultantes de uma diminuição nos teores de esteróis, especialmente de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (fig. III.5), induzidas por níveis tóxicos de auxina durante a germinação. Com base em todas estas evidências experimentais, parece razoável pensar que o efeito das auxinas no crescimento/morfogénese se fará, pelo menos parcialmente, ao nível da regulação do metabolismo dos esteróis, sendo que o papel estrutural dos esteróis será mais relevante nos processos de crescimento/expansão celulares e o de molécula-sinal nos processos morfogénicos.

De acordo com alguns autores, as sementes e os tecidos meristemáticos possuem níveis elevados de  $\beta$ -sitosterol e baixos de estigmasterol (6, 7). Durante a germinação de sementes, e como consequência do desenvolvimento das plântulas, a razão estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol aumenta, principalmente à custa do aumento do primeiro (6, 7, 18, 30). Os resultados obtidos nesta experiência mostraram um aumento na razão estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol especificamente em tecidos e órgãos diferenciados, designadamente plântulas resultantes da germinação de sementes e plântulas regeneradas por organogénese e embriogénese somática (figs. III.5 e III.6). Os valores elevados de  $\beta$ -sitosterol em plântulas em crescimento activo (de sementes ou regeneradas *in vitro* a partir de *calli*) (figs. III.5 e III.6) e a correlação estreita entre o aumento de  $\beta$ -sitosterol e a fase mais activa do crescimento de *calli* não-morfogénicos, são coerentes com um papel importante deste composto em situações de elevada necessidade de componentes lipídicos para a produção de membranas. Estudos realizados com *Phaseolus aureus* (30), em que os conteúdos e as composições das fracções esterólicas foram determinadas em secções de hipocótilo, mostraram igualmente um aumento no teor de esteróis totais e um aumento na razão  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol em tecidos progressivamente mais jovens. Este autores postularam que o  $\beta$ -sitosterol teria um papel activo em processos de crescimento, após o

qual era convertido em estigmasterol. A evolução dos esteróis principais durante o crescimento de *calli* não-morfogénicos de linho mostrou que existe alguma simetria entre estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol na fase final do crescimento activo e início da fase estacionária, revelando também a conversão de  $\beta$ -sitosterol em estigmasterol.

Uma interacção efectiva entre membranas e esteróis requer que estes tenham estruturas moleculares precisas, uma configuração relativamente planar e, pelo menos, uma ligação dupla no anel B. Aumentando a dimensão da cadeia lateral em C-17, aumenta a dificuldade da sua incorporação em membranas de eritrócitos e em lipossomas (37) diminuindo a eficácia da molécula de esterol na estabilização das membranas (7). Segundo Cooke *et al.* (19), em vesículas de membrana plasmática incubadas com estigmasterol ocorre um aumento na fluidez e uma diminuição na actividade das bombas de protões relativamente a vesículas incubadas com colesterol. Como se disse, a permeabilidade da membrana plasmática aumenta segundo a ordem: colesterol < campesterol <  $\beta$ -sitosterol < estigmasterol (6, 18, 37). Alguns autores encontraram uma correlação positiva entre o envelhecimento (do inglês “aging”) do tecido, o aumento da razão estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol, o aumento da permeabilidade à água e a diminuição na actividade enzimática dependente de  $Mg^{2+}$  de membranas plasmáticas de plântulas de *Phaseolus aureus* (18). Os teores de campesterol foram aqueles que sofreram menor variação, não só no mesmo tecido, ao longo do tempo, como entre tecidos diferentes (figs. III.5, III.6 e III.7). Este resultado parece indicar que os níveis de campesterol nas membranas biológicas não deverão variar muito e que a regulação nos níveis específicos de esteróis nas diferentes membranas ocorrerá provavelmente no equilíbrio entre  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. A síntese de campesterol estará provavelmente associada a uma fase de estabilização do crescimento das membranas plasmáticas, podendo uma variação no equilíbrio metabólico entre  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol traduzir a ocorrência de processos celulares dinâmicos. Especificamente, níveis mais elevados de  $\beta$ -sitosterol estarão associados a um crescimento mais activo de tecidos, como é o caso da fase de crescimento exponencial de *calli* não-morfogénicos (fig. III.7), e a elevadas taxas de biogénese de membranas biológicas, como é o caso da germinação de sementes e regeneração de plântulas a partir de *calli* (figs. III.5 e III.6). Os *calli* parecem ter membranas menos ricas em estigmasterol que os restantes tipos de tecidos e órgãos estudados, pelo que um elevado nível deste composto pode ser considerado

como um indicador de tecidos diferenciados de linho. Por outro lado, dos resultados obtidos com o estudo do crescimento/acumulação de esteróis de *calli* não-morfogénicos, a razão estigmasterol/ $\beta$ -sitosterol parece constituir, tal como noutros sistemas, um indicador da fase de crescimento de tecidos meristemáticos.

### *Conclusões e perspectivas*

É importante perceber as relações mecanísticas que explicam e integram o crescimento celular e a biossíntese de esteróis em tecidos mantidos *in vitro*, e ainda o papel dos reguladores de crescimento, nomeadamente auxinas, nestes processos. Os resultados obtidos nestas experiências independentes parecem sugerir que o 2,4-D é uma auxina extremamente eficiente quer na manutenção do crescimento de *calli* não-morfogénicos quer na biossíntese de  $\beta$ -sitosterol. Sabe-se que este regulador de crescimento é considerado, em muitos sistemas explante/espécie, como a auxina de eleição quer na indução de crescimento celular indiferenciado quer na indução de embriogénese somática. *Calli* de *Euphorbia characias* mantidos em presença de 2,4-D também evidenciaram taxas de crescimento mais elevadas e aumento no conteúdo de  $\beta$ -sitosterol durante a fase exponencial de crescimento (11). Com base neste conjunto de observações pode concluir-se que o tipo de auxina utilizado na formulação dos meios de cultura é crucial para a regulação destes processos, e que, provavelmente, a qualidade dos *calli* induzidos, em termos de actividade mitótica e de síntese de esteróis, poderá ser determinante na sua competência para a diferenciação de tecidos ou embriões somáticos.

Na linha do que se havia perspectivado anteriormente, sobre a importância deste sistema experimental no estudo da influência de reguladores de crescimento nos padrões morfológicos de desenvolvimento de plântulas por embriogénese *in vitro*, a constatação de que os padrões de desenvolvimento aberrantes, induzidos por manipulação da suplementação hormonal do meio de germinação, se encontram associados a teores de esteróis livres mais baixos, parece indicar que, este sistema é ainda adequado ao estudo da relação entre reguladores de crescimento e metabolismo dos esteróis na determinação dos fenótipos morfológicos.

## Bibliografia

- 1 **Pedroso M.C.** e Pais M.S. (1995) Factors controlling somatic embryogenesis. Cell wall changes as an in vivo marker of embryogenic competence. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 43, 147-154.
- 2 **Hicks G.S.** (1994) Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30, 10-15.
- 3 **Turnham E.** e Northcote D.H. (1984) The incorporation of [1-<sup>14</sup>C]acetate into lipids during embryogenesis in oil palm tissue cultures. *Phytochemistry* 23, (1) 35-39.
- 4 **Manoharan K.**, Prasad R. e Guha-Mukherjee S. (1987) Greening and shoot-differentiation related lipid changes in callus cultures of *Datura innoxia*. *Phytochemistry* 26 (2), 407-410.
- 5 **Williams M.**, Francis D., Hann A.C. e Harwood J.L. (1991) Changes in lipid composition during callus differentiation in cultures of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* 42 (245), 1551-1556.
- 6 **Grunwald C.** (1975) Plant sterols. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 209-236.
- 7 **Grunwald C.**, Steroids. *In*: E.A. Bell and B.V. Charlwood (Eds.), *Secondary Plant Products*, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 8, Springer Verlag, 1980, pp. 221-254.
- 8 **Goad L.J.**, Phytosterols. *In*: P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 7, Academic Press, 1991, pp. 369-434.
- 9 **Stohs S.J.** e Rosenberg H. (1975) Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures. *Lloydia* 38 (3), 181-194.
- 10 **Fernandes-Ferreira M.**, Novais J.M. e Pais M.S.S. (1992a) Hormonal control of triterpenols synthesis in *Euphorbia characias* calli. *Bioresource Technology* 39, 31-37.
- 11 **Fernandes-Ferreira M.**, Pais. M.S.S. e Novais J.M. (1992b) The effects of medium composition on biomass, sterols and triterpenols production by in vitro cultures of *Euphorbia characias*. *Bioresource Technology* 42, 67-73.
- 12 **Fernandes-Ferreira M.**, Novais J.M. e Pais M.S.S., *Euphorbia characias* L.: in vitro culture and the production of sterols, triterpenols, and hydrocarbon-like compounds. *In*: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants VII*, Vol. 28, Springer Verlag, 1994, pp. 214-235.

- 13 **Schmitt** P., Gaspar T. e Hagège D. (1994) Sterol composition of normal and habituated sugarbeet callus (*Beta vulgaris* L. *Altissima*). In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P, 1-3.
- 14 **Dyas** L., Threlfall D.R. e Goad L.J. (1994) The sterol composition of five plant species grown as cell suspension cultures. Phytochemistry 35, 655-660.
- 15 **Suardi** M.L., Bernasconi S., Pellizoni F. e Racchi M.L. (1994) In vitro cultures of *Solanum malacoxylon* Sendt.: nutritional requirements and sterol production. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 36, 9-14.
- 16 **Guo** D., Venkatramesh M. e Nes D.W. (1995) Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. Lipids 30 (3), 203-219.
- 17 **Ourisson** G. (1994) Peculiarities of sterol biosynthesis in plants. J. Plant Physiol. 143, 434-439.
- 18 **Stallaert** V.M. e Geuns J.M.C. (1994) Phospholipid and free sterol composition of hypocotyl plasma membranes of ageing mung bean seedlings. Phytochemistry 36, 1177-1180.
- 19 **Cooke** D.T., Burden R.S., James C.S., Seco T. e Sierra B. (1994) Influence of sterols on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. Plant Physiol. Biochem. 32, 796-773.
- 20 **Muller** M.M., Kantola R. e Kitunen V. (1994) Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. Mycological Research 98(6), 593-603.
- 21 **Zygadlo** J.A. (1994) A comparative study of sterols in oil seeds of *Solanum* species. Phytochemistry 35(1), 163-167.
- 22 **Wilkomirski** B. e Dubielecka B. (1996) Sterol content as a similarity marker of different organs of two varieties of *Chrysanthemum parthenium*. Phytochemistry 42(6), 1603-1604.
- 23 **Khan** M.M., Jain D.C., Bhakuni R.S., Zaim M. e Thakur R.S. (1991) Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. Plant Sci. 75, 161-165.
- 24 **Willmann** M.R. (2000) Sterols as regulators of plant embryogenesis. Trends in Plant Science 5(10), 1360.
- 25 **Diener** A.C. (2000) STEROLMETHYLTRANSFERASE 1 controls the level of cholesterol in plants. Plant Cell 12, 853-870.
- 26 **Murashige** T. e Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- 27 **Cunha** A. e Fernandes-Ferreira M. (1996) Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax (*Linum usitatissimum* L.). Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 47, 1-8.
- 28 **Fernandes-Ferreira** M. Constituintes Lipídicos Produzidos por Plantas Espontâneas e Micropropagadas, Calli e Células em Suspensão de *Euphorbia characias* L. Subsp.

- characias*. Tese de Doutorado, Universidade do Minho, 1992.
- 29 **Mhaske V.B.** e Hazra S. (1994) Appearance of storage lipid (triglycerides) in somatic embryos of peanut (*Arachis hypogaea* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P, 113-116.
- 30 **Geuns J.M.C.** (1973) Variations in sterol composition in etiolated mung bean seedlings. Phytochemistry 12, 103-106.
- 31 **Lockwood G.B.** e Brain K.R. (1976) Influence of hormonal supplementation on steroid levels during callus induction from seeds of *Trigonella foenumgraecum*. Phytochemistry 15, 1655-1660.
- 32 **Saxena P.K.**, Malik K.A. e Gill R. (1992) Planta 187, 421-424.
- 33 **Murthy B.N.**, Murch S.J. e Saxena P.K. (1995) Physiol. Plant. 94, 268-276.
- 34 **Murch S.J.** e Saxena P.K. (1997) Modulation of mineral and free fatty acid profiles during thidiazuron mediated somatic embryogenesis in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). J. Plant Physiol. 151, 358-361.
- 35 **Brain K.R.** e Lockwood G.B. (1976) Hormonal control of steroid levels in tissue cultures from *Trigonella foenumgraecum*. Phytochemistry 15, 1651-1654.
- 36 **Goodrich-Tanrikulu M.** e Travis R.L. (1995) Plasma membrane phospholipid and sterol synthesis in soybean hypocotyl segments undergoing auxin-induced elongation. Protoplasma 185, 83-92.
- 37 **Geuns J.M.C.** (1975) Regulation of sterol biosynthesis in etiolated mung beans hypocotyl sections. Phytochemistry 14, 975-978.

# IV

---

*Influência de Alguns Parâmetros do Meio de Cultura na Embriogénese  
Somática de Linho (Linum usitatissimum L.):  
efeito da fonte de carbono, do teor de azoto total, do balanço entre iões nitrato e  
amónio e da interacção entre níveis de cálcio e zeatina.*

*Este capítulo foi adaptado e actualizado com base no artigo:*

“Influence of Medium Parameters on Somatic Embryogenesis from Hypocotyl Explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.)”: Effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin”.  
Cunha A. e Fernandes-Ferreira M. (1999) Journal of Plant Physiology 155, 591-597.



## Resumo

Os efeitos de: 1) diferentes fontes de carbono fornecidas a várias concentrações; 2) teor de azoto inorgânico total e do balanço entre os iões nitrato e amónio e; 3) interacção entre diferentes concentrações de cálcio e zeatina, na embriogénese somática a partir de segmentos de hipocótilo de linho, foram estudados em 3 experiências factoriais independentes. O meio basal MS suplementado com concentrações elevadas (4 %) dos monossacarídeos glucose ou frutose resultou na indução de culturas altamente embriogénicas, simultaneamente com elevada produção de embriões somáticos e elevadas taxas de crescimento dos embriões somáticos, quando comparadas com as culturas mantidas em meios suplementados com sacarose ou maltose. Embora o meio com maltose tenha dado bons resultados na gama de concentrações testadas (1 - 4 %), a suplementação com sacarose a 4 %, parece ter inibido a indução e desenvolvimento de embriões somáticos. Independentemente do efeito do teor de azoto inorgânico, o balanço entre as formas iónicas,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , desempenhou um papel fundamental na indução da embriogénese somática e no desenvolvimento dos embriões somáticos. O nitrato foi determinante na diferenciação e crescimento de *calli*, sendo que teores elevados de amónio aumentaram a frequência de embriões somáticos. Neste sistema, o compromisso entre o crescimento de *calli* não-embriogénicos *versus calli* com capacidade embriogénica, induzidos a partir de segmentos de hipocótilo de linho, foi fortemente determinado pela interacção entre níveis cálcio e ZEA, de tal modo que, um balanço  $\text{Ca}^{2+}$ /ZEA elevado se traduziu num baixo potencial embriogénico e num elevado crescimento dos *calli*. Uma elevada concentração de ZEA foi essencial para o desenvolvimento normal dos embriões somáticos.

## Introdução

As biotecnologias para o melhoramento vegetal são importantes para ultrapassar algumas das limitações tradicionais (1) mas também para fornecer modelos reprodutíveis para o estudo fundamental dos processos de regeneração de plantas *in vitro*.

A embriogénese somática constitui um dos sistemas de regeneração mais adequados para a engenharia genética e para a propagação vegetativa de plantas (1), pois permite a produção de plantas geneticamente uniformes em larga escala, a partir de genótipos de interesse obtidos quer por manipulação *in vitro*, quer por técnicas tradicionais de melhoramento de plantas.

A definição de um protocolo simples de indução de embriogénese somática que obvie a manipulação das culturas, evitando por exemplo, transferências sequenciais para diferentes meios de cultura, maximizando ao mesmo tempo o rendimento embriogénico, constitui uma medida que deve ser implementada, para cada sistema, quando se pretende um processo de micropropagação eficaz.

A composição do meio de cultura é um dos factores chave que afecta a morfogénese *in vitro* (2). Porém, é importante ter presente que os requisitos específicos para qualquer processo de crescimento e diferenciação celulares dependem ainda da espécie, da natureza e estado fisiológico dos tecidos (3). O conhecimento dos factores fundamentais e das suas interacções em cada sistema *in vitro* fornecerá a base racional para a optimização do sistema de micropropagação. A importância da fonte de carbono e energia, o azoto total e balanço entre as formas iónicas  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , bem como o tipo de auxina foram considerados como alguns dos factores mais determinantes na proliferação de culturas embriogénicas (1). Qualquer via morfogénica exige elevados suprimentos energéticos (4), razão pela qual as fontes de C e N têm particular importância. Por outro lado, é reconhecido ao cálcio um importante papel na regulação de muitos processos fisiológicos. Desde o trabalho de Haberlandt (5) que a sacarose tem sido a fonte de C mais amplamente utilizada em culturas de tecidos. No entanto, a

sacarose nem sempre é o hidrato de carbono mais adequado para a regeneração *in vitro* das diferentes espécies (6). A composição azotada do meio é susceptível de afectar a actividade de enzimas envolvidas no metabolismo do azoto (2), sendo que as exigências no que respeita à fonte de N, para a embriogénese somática, são dependentes das espécies e dos genótipos (7). Sabe-se ainda que a modelação da concentração intracelular de cálcio está envolvida em vários processos de diferenciação celular (8), parecendo ser particularmente importante na formação e desenvolvimento de embriões somáticos (9).

Embora exista actualmente um vasto trabalho acumulado, relacionado com os efeitos de reguladores de crescimento e de nutrientes na embriogénese somática de variadíssimas espécies, verifica-se que existe, paralelamente, uma enorme variabilidade e alguma discrepância nos resultados descritos na literatura. Para além das diferenças específicas, as diferentes condições de cultura utilizadas (nomeadamente o uso de meios de cultura complexos), os diferentes sistemas biológicos usados como explantes primários (células, tecidos, órgãos, embriões zigóticos), os estados fisiológicos dos mesmos (idade, grau de maturação, condições de crescimento) e a potencial especificidade genotípica na resposta ao estímulo embriogénico (7), contribuirão certamente para a variabilidade e discrepância observadas.

A regeneração de linho (*Linum usitatissimum* L.) através do processo de embriogénese somática foi já obtida a partir de embriões zigóticos imaturos (10) e, como foi descrito no capítulo II, a partir de segmentos de hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro* (11, 12). No entanto, pouca informação existe disponível no que diz respeito aos efeitos de factores do meio na embriogénese somática do linho. Neste contexto, assumiu-se como objectivo principal deste trabalho a determinação do efeito de diferentes constituintes do meio de cultura, na embriogénese somática, designadamente:

- **tipos e concentrações de açúcares** usados como fonte de carbono e energia;
- teor de **azoto inorgânico total** e **balanço** entre as **formas iónicas** oxidada ( $\text{NO}_3^-$ ) e reduzida ( $\text{NH}_4^+$ ); e
- **interacção** entre os níveis de **cálcio** e **ZEA**; de modo a poder otimizar um protocolo de embriogénese somática para o linho.

## *Material e Métodos*

### *1 – Material vegetal e condições de cultura*

Sementes de linho foram esterilizadas quimicamente e deixadas a germinar *in vitro* em meio MS0 (sem suplementação hormonal) como descrito no Capítulo II (11). Segmentos de hipocótilo foram obtidos a partir de plântulas com uma semana de idade e usados como explantes primários nas diferentes experiências. De modo a evitar efeitos topológicos, relacionados com gradientes endógenos (hormonais e devido à idade fisiológica das células) na resposta embriogénica e portanto na reprodutibilidade, apenas os segmentos sub-cotiledonares (SH) ou segmentos distais (ver fig II.6) foram usados como explantes primários. Estes segmentos foram colocados em tubos de cultura em meio basal MS suplementado com 0,4 mg/l de 2,4-D e 1,6 mg/l de ZEA (MS5) (11). As concentrações dos nutrientes testados e da ZEA foram modificados de acordo com cada tratamento como se descreve no ponto 3. As culturas foram mantidas em sala de culturas de ambiente controlado, num regime de fotoperíodo de 16 h (*ca.* de 50  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ), a uma temperatura de aproximadamente 25 °C, durante 5 semanas, ou durante 6 semanas no caso da experiência em que se testou simultaneamente o cálcio e a ZEA. No final do período experimental, o material foi colhido e os diferentes tipos de tecidos ou estruturas – *calli* não-embriogénicos (CNE), *calli* embriogénicos (CE) e respectivos embriões somáticos (ES) – foram separados e pesados.

### *2 – Variáveis estimadas e cálculo do rendimento embriogénico*

Para estudar os efeitos dos referidos constituintes do meio foram realizadas 3 experiências independentes, nas mesmas condições ambientais, e determinadas as seguintes variáveis:

- a) **percentagem de indução de embriogénese somática (%)** - medida como a proporção de explantes que produziram pelo menos um embrião somático;

- b) **número médio de embriões somáticos produzidos por explante ou cultura embriogénica;**
- c) **peso fresco médio dos embriões somáticos (mg)** - calculado a partir do conjunto de todos os embriões obtidos em cada tratamento; e
- d) **peso fresco médio dos calli (g)** - estimado a partir de replicados compostos.

De modo a comparar a eficiência embriogénica dos diferentes tratamentos, determinou-se o parâmetro **rendimento embriogénico** definido como o produto das variáveis a, b e c, numa base mensal. Este parâmetro pode portanto ser usado como medida da eficiência dos diferentes meios de cultura testados, na regeneração de plântulas de linho por embriogénese somática.

### *3 – Tratamentos experimentais*

#### *3.1 – Fontes de carbono*

Tendo como referência o tipo e concentração da fonte de carbono utilizados tradicionalmente na preparação do meio MS (contendo sacarose a 2 %) foram testados ainda os açúcares **maltose**, **glucose** e **frutose**, nas concentrações de **1, 2 e 4 %**, adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. Neste ensaio utilizou-se um desenho factorial completo de 4x3 (4 açúcares a 3 níveis) com 4 blocos aleatórios e 14 culturas por tratamento.

#### *3.2 – Teor total de azoto (N) inorgânico e balanço entre as formas iónicas ( $\text{NO}_3^-$ e $\text{NH}_4^+$ )*

Foram testados 2 níveis de N inorgânico total (30 e 60 mM) e 3 proporções molares (1:2, 1:1 e 2:1) das duas formas iónicas ( $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ), sendo a constituição normal do meio MS: N = 60 mM na proporção de iões de 2:1. O N inorgânico foi adicionado na forma dos sais do meio MS ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ ). No caso da proporção 1:2, o  $\text{NH}_4^+$  extra foi adicionado na forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O desenho factorial utilizado foi de 2x3, com 3 blocos aleatórios e 21 culturas por tratamento.

Especificamente neste ensaio, os *calli* embriogénicos e os não-embriogénicos foram amostrados separadamente dado que apresentavam dimensões visualmente diferentes. Deste modo estimou-se a variável d) para ambas as situações (CNE e CE).

### *3.3 – Níveis de cálcio e interacção com zeatina*

Neste ensaio foram testadas 2 concentrações de  $\text{CaCl}_2$  (1,5 e 3,0 mM, correspondendo esta última à concentração normal do meio MS) numa combinação factorial completa com 2 níveis de ZEA (0,4 e 1,6 mg/l) tendo sido alocadas para cada um dos 2x2 tratamentos 21 culturas. A selecção dos níveis de ZEA prenderam-se com resultados de experiências anteriores, referidas no capítulo II, que mostraram que meio MS suplementado com 0,4 mg/l de 2,4-D + 0,4 mg/l de ZEA era menos eficiente na indução de embriogénese somática do que uma suplementação com 0,4 mg/l de 2,4-D + 1,6 mg/l de ZEA (MS5).

## *4 – Análise estatística*

Variáveis aleatórias na forma de frequências ou proporções (caso da percentagem de indução de embriogénese somática), apresentadas como tabelas de contingência multidimensionais, foram analisadas por modelos Log-lineares (ver Apêndice C). Os resultados obtidos com variáveis paramétricas contínuas foram analisados pelo teste ANOVA. A variável “nº de embriões somáticos por explante embriogénico” foi sujeita à transformação matemática “raíz quadrada da variável”. Os dados apresentados são no entanto os valores reais determinados. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica@4.1 da StatSoft, Inc.

## Resultados e Discussão

### *I – Efeito da fonte de carbono no crescimento de calli e na embriogénese somática*

Tem sido constatado que a fonte de carbono do meio de cultura, bem como a concentração utilizada, podem desempenhar papéis importantes em diferentes estágios dos processos de regeneração de plantas *in vitro* (6, 13), designadamente da embriogénese somática (14). Embora a maioria dos meios usados em cultura de células e tecidos vegetais contenham sacarose como fonte de carbono e energia (4), vários artigos têm revelado que o efeito positivo dum determinado açúcar no processo de embriogénese somática parece ser específico das diferentes espécies estudadas (6, 15, 16).

Dois factos que se tornaram evidentes do conjunto de resultados obtidos neste trabalho foi que, os monossacarídeos e os dissacarídeos se comportaram de modo distinto em termos da eficiência embriogénica e do crescimento de *calli* e que a sacarose induziu uma resposta embriogénica globalmente diferente da induzida pela maltose (Tabela IV.1). A baixas concentrações (1 e 2 %), os dissacarídeos foram muito mais eficientes na indução da embriogénese somática que os monossacarídeos. As elevadas taxas de indução obtidas com os dissacarídeos naquelas concentrações foram atingidas pelos monossacarídeos apenas na concentração de 4 %. O aumento de concentração de maltose no meio, de 2 para 4 % não resultou em alterações significativas da percentagem de indução. No caso da sacarose porém, a percentagem de indução diminuiu cerca de 44 % quando a sua concentração no meio duplicou para 4 % (Tabela IV.1). Este decréscimo foi acompanhado por uma redução da frequência de embriões somáticos produzidos e da respectiva taxa de crescimento (Tabela IV.1). Li *et al.* (17) observaram, igualmente, que a maltose a 4 % era mais eficiente que a sacarose na maturação dos ES em culturas embriogénicas de *Pinus taeda*.

Tabela IV.1 – Efeitos do tipo e concentração da fonte de carbono na embriogénese somática e no crescimento de *calli* induzidos a partir de segmentos de hipocótilo de linho. Os valores das diferentes variáveis aleatórias foram determinadas após 5 semanas de cultura. O peso fresco total de ES produzidos por cultura numa base mensal foi determinado como medida do rendimento ou produtividade embriogénica. Em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

Açúcares	Concentração (% p/v) (mM)		Indução de embriogénese somática (%)	Nº ES / culturas embriogénicas	Peso fresco de <i>calli</i> (g)	Peso fresco dos ES (mg)	Rendimento em ES (mg/mês/expl)
Sacarose	1	28	64,3	3,1 a	0,4 a	nm	-
	2	59	64,3	6,1 ab	0,6 ab	14	45
	4	117	35,7	3,8 a	1,28 c	5	5
Maltose	1	28	64,3	3,5 a	0,4 a	0,9	2
	2	59	78,6	5,0 ab	0,6 ab	6	19
	4	117	71,4	6,3 ab	0,85 bc	24	92
Glucose	1	56	0	-	0,64 ab	-	-
	2	111	42,9	5,0 ab	0,98 c	45	81
	4	222	71,4	11,4 b	1,18 c	58	423
Frutose	1	56	35,7	2,8 a	0,55 ab	2	7
	2	111	35,7	4,4 ab	1,05 c	27	37
	4	222	71,4	8,3 ab	1,04 c	72	312

Comparações *post-hoc* foram realizadas utilizando o teste Duncan e o teste Tukey (HSD) para analisar os resultados obtidos quanto ao número de ES e o peso fresco de *calli*.  
nm – não mensurável, abaixo do limite de pesagem.

Com base na análise log-linear verificou-se que, isoladamente, os factores “tipo de hidrato de carbono” ( $\chi^2 = 22,17$ ;  $P = 0,1379$ ) e “concentração” ( $\chi^2 = 26,43$ ;  $P = 0,0904$ ) não foram suficientes para explicar a variação na indução da embriogénese somática, mas apenas a sua interacção ( $\chi^2 = 31,2$ ;  $P = 0,0018$ ).

A diminuição da capacidade embriogénica das culturas determinada pelo aumento da concentração de sacarose de 2 para 4 %, não pode contudo ser atribuída directamente a um efeito osmótico já que, meios com osmolaridade semelhante (meio com maltose) ou superior (meios com monossacarídeos) foram utilizados e, nestes casos, não se verificou tal diminuição. Os trabalhos realizados com *Pinus taeda* (17) mostraram inclusivamente, que a diminuição do potencial osmótico ( $-\Psi_{\pi}$ ) tinham favorecido o desenvolvimento dos ES. Uma explicação possível seria a ocorrência de uma interacção



negativa entre glucose e frutose cuja presença conjunta poderia resultar da hidrólise da sacarose durante a autoclavagem ou da actividade de invertases apoplásticas presentes nas culturas. Sendo a hidrólise da sacarose durante a autoclavagem do meio de cultura uma reacção altamente dependente do pH (4), verificámos que nas condições testadas o problema deveria ser negligenciável, havendo autores que afirmam nem 2 % deste açúcar ser hidrolisado (3). Uma segunda explicação passa por uma inibição causada por níveis elevados deste dissacarídeo. É conhecido o duplo papel dos açúcares adicionados ao meio de cultura, actuando como compostos nutricionais e regulatórios (4). Usando meio de Monnier suplementado com sacarose a 5 %, Pretová e Williams (10) não conseguiram induzir embriogénese somática de linho a partir de embriões zigóticos imaturos, a não ser que adicionassem ao meio de cultura glutamina e extracto de levedura. Vários outros sistemas revelaram ainda ser a maltose o açúcar mais adequado para a produção de ES. Em culturas de *Hevea brasiliensis* (6), a maltose (234 mM  $\approx$  8 %) aumentou esta produção comparativamente a concentrações iguais de sacarose, glucose ou frutose. De modo semelhante, King e Kasha (18) obtiveram um número máximo de embriões somáticos, a partir de *calli* derivados de embriões imaturos de centeio (*Hordeum vulgare* L.), com maltose a 6 % e um número muito baixo com sacarose nas concentrações de 3 e 6 %. Estes autores excluíram a hipótese dum efeito osmótico explicar os resultados obtidos. Efeitos inibitórios de concentrações elevadas de sacarose na embriogénese somática foram igualmente observados em sistemas *in vitro* de outras espécies, nomeadamente, a partir de pecíolos de *Medicago sativa* (19), de cotilédones imaturos de *Manihot esculenta* (15) e de *Feijoa sellowiana* (13) e de *callus* autónomo de *Beta vulgaris* (7). Outros autores obtiveram resultados bastante diferentes. Assim, concentrações de sacarose superiores a 5 % e a 150 mM, e concentrações de 252 mM, de 350 mM e de 12 % foram necessárias para maximizar a indução de embriogénese somática e a frequência de ES produzidos em, tecidos cotiledonares imaturos de *Azadirachta indica* (20), explantes cotiledonares de *Cucumis sativus* (16), ápices caulinares de plântulas de *Pisum sativum* (21), embriões zigóticos imaturos de *Helianthus annuus* (22) e embriões zigóticos imaturos de *Zea mays* (23), respectivamente. Foram ainda descritos efeitos inibitórios da maltose na embriogénese somática a partir de explantes cotiledonares de *Cucumis sativus* (24) e de tecidos cotiledonares imaturos e eixos embriónicos de *Arachis hypogea* (25). Esta diversidade

de respostas, apenas no que diz respeito aos dissacarídeos sacarose e maltose, parecem indicar que, mais do que de um efeito osmótico ou mesmo químico, a resposta embriogénica ao tipo e teor de açúcar, adicionado ao meio de cultura como fonte de C e energia, dependerá da espécie e do tipo de explante em questão, bem como da interação com outros componentes do meio, nomeadamente compostos azotados.

Relativamente aos monossacarídeos, há vários registos que revelaram ineficiência da frutose na indução da embriogénese somática a partir de embriões zigóticos imaturos de *Helianthus annuus* (22) e de *calli* de *Asparagus officinalis* (14). De facto, em baixas concentrações, os monossacarídeos testados provaram ser bastante ineficazes quer para a indução quer para o desenvolvimento dos embriões somáticos. Para além desta baixa produtividade geral, foi observada ainda a produção de estruturas translúcidas tipo folha - foliose - em culturas mantidas na presença de 1 % de glucose ou de frutose ou na presença de 2 % de glucose. O aspecto altamente hidratado destas folhas parece reflectir um problema de hiperhidricidade, fenómeno geralmente observado em culturas mantidas em meios sólidos em ambientes de elevada humidade ou em meios líquidos (4). Em concentrações mais altas (4 %), os monossacarídeos induziram as mais elevadas frequências e taxas de crescimento de embriões somáticos, determinando assim, os mais altos rendimentos embriogénicos a partir de segmentos de hipocótilo de linho (Tabela IV.1).

Relativamente ao crescimento dos *calli* verificou-se um efeito muito significativo da concentração do hidrato de carbono. Concentrações de 2 a 4 % de monossacarídeos ou de 4 % de dissacarídeos resultaram em *calli* mais compactos e com maior crescimento (Tabela IV.1). Segundo Blanc *et al.* (6) o crescimento de *calli* de *Hevea brasiliensis* por efeito da sacarose, foi *ca.* de 2x superior ao crescimento obtido por efeito da glucose, frutose ou maltose. Embora na concentração de 4 %, os nossos dados sugiram maior eficiência da sacarose no crescimento de *calli*, as diferenças observadas entre os 4 açúcares testados, para a mesma concentração, não foram estatisticamente significativas. Nuutila *et al.* (26), numa abordagem estatística ao problema da optimização dos níveis de sacarose para a embriogénese somática e para o crescimento de *calli* de bétula (*Betula pendula* Roth.) verificaram que o valor de sacarose que maximizava a indução de embriogénese somática a partir de *callus* (2,1 %) era inferior

ao valor que maximizava o crescimento dos respectivos *calli* (3,4 %). Resultados semelhantes foram obtidos com *calli* derivados de diferentes cultivares de *Citrus* (27).

A estimativa dum parâmetro de produtividade em embriões somáticos (mg peso fresco/ explante/mês), comparável nos vários tratamentos, permitiu avaliar os diferentes meios quanto à sua eficiência na regeneração de plântulas de linho por embriogénese somática (última coluna da Tabela IV.1). Com base neste parâmetro pode dizer-se que a suplementação do meio MS com glucose ou frutose em concentrações elevadas (4 %), serão escolhas adequadas para o estabelecimento dum sistema para a indução e desenvolvimento de embriões somáticos a partir de hipocótilos de linho. A sacarose em concentração elevada (4 %) pode constituir um bom compromisso para o crescimento de *calli* não-morfogénicos.

## 2 – Efeitos do azoto inorgânico total e do balanço entre os iões nitrato e amónio no crescimento de *calli* e na embriogénese somática

O azoto (N) é um elemento fundamental na formulação de meios para culturas de células e tecidos vegetais, sendo essencial para a síntese de DNA, RNA e proteínas (28) e ainda para a produção de clorofila em tecidos clorofilinos/fotossintéticos (29). A forma em que o N é fornecido (oxidada ou reduzida, orgânica ou inorgânica) tem dos mais pronunciados efeitos no crescimento e na diferenciação de culturas de tecidos vegetais (30). Neste conjunto de experiências, o azoto foi adicionado ao meio de cultura sob a forma dos compostos do meio MS normal, ou seja, nas formas iónicas nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amónio ( $\text{NH}_4^+$ ), ambas utilizáveis pelas células, e na forma orgânica pela adição de 2 mg/l de glicina (Apêndice A). Um esforço de investigação assinalável tem sido desenvolvido no sentido de estudar o efeito de ambas as formas iónicas de N no processo de embriogénese somática. Porém, os resultados obtidos são algo contraditórios. Embora se acredite que o nitrato seja fundamental para o crescimento dos tecidos vegetais, o papel do N inorgânico reduzido, bem como o papel do N orgânico, não são tão bem conhecidos. De acordo com Rangaswamy (31), o N na forma reduzida é essencial especialmente na fase de indução da embriogénese somática. Em estudos realizados com culturas de *calli* de *Daucus carota* verificou-se que, não só a entrada de  $\text{NH}_4^+$  é superior durante as primeiras fases da embriogénese somática (8), como este ião é indispensável para o início da embriogénese e maturação dos embriões

somáticos desta (32, 33), e de outras espécies. Essa necessidade específica foi atribuída ao aumento da síntese proteica que ocorre durante aquelas fases. O aumento de  $\text{NH}_4^+$  ou de N orgânico (aminoácidos) no meio de cultura estimulou, igualmente, a indução de *calli* embriogénicos em *Shorgum bicolor* (34). Em contrapartida, Kamada e Harada (35) concluíram com base nos seus estudos em culturas de *Daucus carota* que, a fase de indução era independente dos compostos azotados do meio enquanto que, a fase de desenvolvimento dos embriões somáticos requeria N reduzido. A Tabela IV.2 resume os resultados obtidos.

Tabela IV.2 – Efeitos de dois níveis de azoto inorgânico testados em 3 proporções diferentes de nitrato:amónio na embriogénese somática e no crescimento de *calli* induzidos a partir de segmentos de hipocótilo de linho, determinados após 5 semanas de cultura. O peso fresco total de ES produzidos por cultura, numa base mensal, foi igualmente calculado como medida do rendimento ou produtividade embriogénica. Em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

N total (mM)	Nitrato:amónio (proporção) (mM)		Indução de embriogénese somática (%)	Nº ES / culturas embriog.	Peso fresco CNE (g)	Peso fresco CE (g)	Peso fresco ES (mg)	Rend. em ES (mg/mês/expl)
30	1:2	10:20	38,1	3,1 a	0,016 a	0,016 a	nm	-
	1:1	15:15	90,5	4,2 ab	0,333 b	0,349 b	12,0	39
	2:1	20:10	57,1	3,3 a	0,817 e	0,694 d	7,4	13
60	1:2	20:40	71,4	6,6 bc	0,692 d	0,377 b	10,5	40
	1:1	30:30	90,5	2,8 a	0,439 b	0,424 b	14,6	32
	2:1	40:20	71,4	4,5 a	0,550 c	0,391 b	4,3	10

Comparações *post-hoc* foram realizadas utilizando o teste Duncan e o teste HSD Tukey para analisar os resultados obtidos para o número de ES e o p. f. de *calli*.

nm – não mensurável, abaixo do limite de pesagem.

Para além de um eventual efeito da concentração de N inorgânico total ( $\chi^2 = 14,58$ ;  $P = 0,067$ ) e de não se ter verificado um efeito significativo da proporção  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  *per se* na indução da embriogénese somática, foi observado um efeito altamente significativo ( $\chi^2 = 35,18$ ;  $P = 0,00004$ ) da interacção entre estes factores. Independentemente do teor de N total, a percentagem máxima de indução (90,5 %), ao fim de 5 semanas, foi obtida com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na proporção de 1:1, sendo mais elevada do que a obtida com meio MS normal (N inorgânico total = 60 mM e uma proporção  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  de 2:1) (Tabela IV.2). Observou-se ainda que a percentagem de indução diminuiu quando a proporção

entre as duas formas iónicas se afastou da igualdade (Tabela IV.2). Essa diminuição foi contudo mais pronunciada nos tratamentos onde o nível de N total foi mais baixo, isto é, os valores de indução nas proporções de 1:2 e 2:1 foram mais baixos com N = 30 mM do que com N = 60 mM (Tabela IV.2).

Tendência semelhante ocorreu no crescimento dos embriões somáticos produzidos sob o efeito dos diferentes tratamentos em que a proporção 1:1 foi a mais favorável. No caso desta variável, as situações mais desfavoráveis ocorreram com os valores extremos de nitrato (10 e 40 mM) (Tabela IV.2). Os explantes mantidos em meio MS com 10 mM de nitrato mostraram-se, de um modo geral, menos reactivos e com viabilidade comprometida. Apresentavam coloração amarelada, formação de *callus* muito incipiente (Tabela IV.2), essencialmente nas superfícies de corte e de contacto com o meio, e morfogénese directa. As estruturas produzidas não apresentaram desenvolvimento subsequente (Tabela IV.2) pelo que não foi possível, na maioria dos casos, confirmar a sua natureza (ES ou rebentos caulinares).

O número de embriões somáticos produzidos por cultura embriogénica não foi significativamente afectado pelo nível de N total ou pela proporção  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  *per se*. Apenas o tratamento N = 60 mM na proporção de 1:2, ou seja, com o nível de ião amónio mais elevado (40 mM), determinou frequências significativamente mais elevadas comparativamente aos restantes tratamentos (a interacção entre variáveis com  $P < 0,001$ ). Pode acrescentar-se, no entanto, que o aumento da concentração de  $\text{NH}_4^+$  de 10 para 40 mM, em presença de 20 mM de  $\text{NO}_3^-$ , duplicou o número de ES por cultura embriogénica, enquanto que, o aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$  de 10 para 40 mM, em presença de 20 mM de  $\text{NH}_4^+$ , não resultou em qualquer variação significativa daquela variável. Estes resultados são coerentes com as inferências de alguns autores já referenciados, segundo os quais, a disponibilidade de N inorgânico na forma reduzida ( $\text{NH}_4^+$ ) é fundamental na embriogénese somática (8, 31, 32, 33).

Os efeitos diferenciais do teor em N inorgânico total e da proporção  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  nas variáveis descritoras da capacidade embriogénica (“% de indução”, “nº de ES/cultura embriogénica” e “peso fresco dos ES”), já discutidos especificamente, resultaram em rendimentos embriogénicos mais elevados nos tratamentos 1:1 e no tratamento com o nível de ião amónio mais elevado (Tabela IV.2).

No que diz respeito ao crescimento dos *calli* verificou-se que, no final do ensaio, *calli* embriogénicos e não-embriogénicos apresentaram, em geral, crescimentos diferentes (Tabela IV.2), sendo que ambos os factores N testados (N inorgânico total e proporção  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ) tiveram efeitos significativos. O aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$ , em proporção inversa com a de  $\text{NH}_4^+$ , mantendo o teor de N total em 30 mM, levou ao aumento significativo e proporcional do crescimento, quer dos CNE quer dos CE, tendo-se obtido os valores máximos de crescimento de ambos os tipos de *calli*, no tratamento N = 30 mM na proporção 2:1 (Tabela IV.2). Efeito semelhante não foi verificado quando se fez variar as concentrações das duas formas iónicas, igualmente de forma inversa, mas para o nível de N = 60 mM. O aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$  de 10 para 40 mM na presença de 20 mM de  $\text{NH}_4^+$  traduziu-se no aumento significativo do crescimento, tendo o inverso ocorrido quando se aumentou a concentração de  $\text{NH}_4^+$  de 10 para 40 mM, na presença de 20 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Comparando ainda os dois tratamentos  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  nas proporções 2:1 (Tabela IV.2) constata-se que, da situação em que N total era de 30 mM para a situação em que N total era de 60 mM, houve um menor crescimento dos *calli*. Estes resultados sugerem haver por um lado, uma limitação do crescimento dos *calli* de linho pelo nitrato e, por outro, uma inibição por elevados teores de N total. Esta ideia é consistente com resultados obtidos na embriogénese somática de *Glycine max* por Samoylov *et al.* (1) os quais constataram que níveis de N total e de  $\text{NO}_3^-$  superiores a 35 e 28 mM, respectivamente, se traduziram na diminuição da proliferação das culturas de *calli* embriogénicos. Globalmente, os resultados obtidos permitem inferir que, relativamente ao linho, o aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$ , na presença de teores adequados de  $\text{NH}_4^+$ , favorece o desenvolvimento de *calli* (CNE e CE) ao passo que uma concentração elevada de  $\text{NH}_4^+$  favorece a produção de embriões somáticos. A variação observada para os *calli* não-embriogénicos nos tratamentos N = 60 mM (Tabela IV.2) não é, porém, de interpretação directa. Mais uma vez, só uma interacção entre os níveis de N inorgânico total e o balanço entre as formas iónicas em que o N é fornecido ao meio poderão explicar a resposta obtida relativamente ao crescimento. Nuutila *et al.* (26) constataram também que o nível óptimo de N (28 mM) para o desenvolvimento de culturas de *calli* de *Betula pendula* era inferior ao estimado para otimizar a percentagem de indução de embriogénese somática (35 mM).

Devido ao processo embriogénico, os CE têm exigências em C e energia mais elevadas que os CNE (6). Consequentemente, o menor crescimento atingido pelos CE, em níveis de nitrato não limitantes para o crescimento, pode ser explicado por uma maior alocação do C nestes *calli* para sustentar o crescimento dos tecidos embrionários em desenvolvimento. Uma diferença entre CNE e CE foi igualmente visível no tratamento “N = 30 mM/ 2:1” (Tabela IV.2). Para baixos teores de N (30 mM), apenas se notou diferença no crescimento de CNE e CE naquele tratamento provavelmente pelo facto de ter um nível de nitrato já não limitante para o crescimento celular.

Comparando os resultados obtidos nestas duas experiências (açúcares e azoto) relativamente ao crescimento dos *calli*, podemos constatar, em primeiro lugar, que os resultados são directamente comparáveis (comparar tratamento “sacarose/2 %” na Tabela IV.1 com tratamento “N = 60 mM/2:1” na Tabela IV.2) e em segundo lugar, que os *calli* obtidos com níveis de 4 % de açúcares são significativamente maiores que os obtidos em qualquer dos tratamentos com N. Isto significa que a concentração de sacarose de 2 % não é a mais adequada para o crescimento de *calli* e, portanto, exigências energéticas adicionais, associadas à embriogénese somática, poderão traduzir-se na diminuição do crescimento. Esta derivação do C para a embriogénese, em detrimento do crescimento do *callus*, que ocorre em condições de fonte de C limitante, poderá explicar as diferenças de crescimento entre CNE e CE nas condições em que os níveis de N não são limitantes. Embora a ausência de qualquer das formas iónicas de N inorgânico (reduzida ou oxidada) não tivesse sido testada, basicamente porque se acreditou serem vitais para o estabelecimento das culturas, os resultados obtidos com esta experiência apoiam a ideia de que é fundamental a existência duma concentração mínima de nitrato, que não é substituível por amónio, para que haja o crescimento dos tecidos de linho mantidos em cultura *in vitro* (explantes, *callus* ou embriões somáticos) e de que é importante uma concentração elevada de amónio (40 mM) para se obterem elevadas frequências de embriões somáticos a partir de *calli* embriogénico derivado de hipocótilos de linho (Tabela IV.2). A exigência em  $\text{NH}_4^+$  para a indução de embriogénese somática e diferenciação foi verificada por outros autores em diferentes espécies e sistemas de cultura *in vitro* (1, 8, 19, 32, 33, 34, 35, 36, 37).

Relativamente ao efeito do balanço  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  na indução da embriogénese somática, embora alguns autores tenham obtido resultados semelhantes aos nossos (33, 34, 38),

existem poucos trabalhos descritos que tivessem controlado este factor, essencialmente devido à utilização de azoto orgânico na formulação dos meios de cultura, os quais podem substituir total ou parcialmente o  $\text{NH}_4^+$ . Sabendo, contudo, que a entrada deste ião nas células é mais rápida que a do ião  $\text{NO}_3^-$  (3) e que é mais elevada durante o início da embriogénese somática (8), e que, por outro lado, células crescidas apenas em  $\text{NH}_4^+$  são incapazes de utilizar outras fontes de N do meio devido à inactivação da nitrato reductase e, parcialmente, da glutamina sintetase (2), um balanço adequado entre estes iões pode ser fundamental para a actividade das enzimas envolvidas no metabolismo do N e, assim, fazer face ao aumento da síntese proteica associado ao arranque da embriogénese somática (8).

Comparando as Tabelas IV.1 e IV.2, pode constatar-se a importância de testar fontes de carbono alternativas à tradicional sacarose juntamente com diferentes formulações de fonte de azoto, tendo especial atenção ao balanço dos iões inorgânicos, quando se pretendem otimizar meios de cultura para obtenção de biomassa de *callus* ou para obtenção de embriões somáticos a partir de segmentos de hipocótilo de linho.

### *3 – Efeitos do teor de cálcio e de ZEA no crescimento de calli e na embriogénese somática*

A participação do cálcio intracelular num vasto número de processos fisiológicos e do desenvolvimento de plantas, a modulação dos seus níveis e compartimentalização intracelular, através de inúmeros estímulos externos, têm sido largamente documentadas (39). Os iões cálcio actuam como segundos mensageiros na transdução de sinais extracelulares e são responsáveis pela estabilidade membranar e pela rigidez da parede celular (40). Estes iões são ainda considerados modeladores de muitas reacções químicas e bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento das plantas, devendo, portanto, actuar num ponto de convergência de modo a integrar vários sinais diferentes (41). Existem algumas referências que põem em evidência a importância da adição de cálcio ao meio de cultura na diferenciação celular e morfogénese (42) e, especificamente, na embriogénese somática (40, 43, 44).

As citocininas são reguladores de crescimento conhecidos pelo seu papel na regulação da divisão celular em culturas de tecidos, encontrando-se também descrito o seu efeito ao nível do desenvolvimento normal de embriões somáticos em plântulas (45). A



interacção citocinina- $\text{Ca}^{2+}$  foi notada em alguns sistemas (39) embora nunca associada com a embriogénese somática. Neste contexto, o objectivo principal desta experiência foi estudar os efeitos do cálcio e da interacção cálcio-citocinina nos processos de crescimento celular e da embriogénese somática do linho.

As variáveis analisadas foram as mesmas das experiências anteriores estando os resultados obtidos representados nas figuras IV.1 a IV.5. Comparando as figuras IV.1 e IV.2 torna-se evidente que a indução da via embriogénica se encontra inversamente relacionada com a formação e crescimento de *calli*. Apenas a forte interacção entre os dois factores explicaram a mudança no padrão de crescimento/desenvolvimento por efeito de elevada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (3 mM) e baixa concentração de ZEA (0,4 mg/l) ( $\chi^2 = 15,73$ ;  $P = 0,0034$ ).

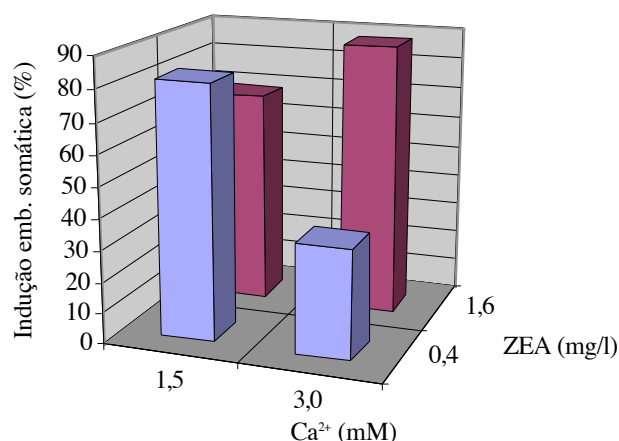
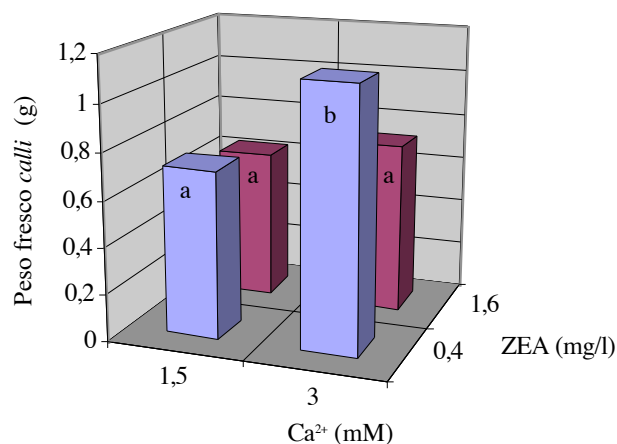


Figura IV.1 – Efeito de diferentes níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e ZEA do meio de cultura na indução de embriogénese somática no final de 5 semanas de cultura.



Figuras IV.2 – Efeito de diferentes níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e ZEA do meio de cultura no peso fresco dos *calli* no final de 5 semanas de cultura. As colunas com letras iguais não são significativamente diferentes.

Alguns rebentos caulinares foram produzidos por organogénese directa com este último tratamento. Já anteriormente se tinha constatado que concentrações de ZEA desta ordem de grandeza, juntamente com 2,4-D, promoviam a caulogénese a partir de segmentos de hipocótilo de linho, enquanto que concentrações superiores a 0,8 mg/l diminuía a ocorrência deste fenómeno (Capítulo II). A diminuição da indução de embriogénese em favor do maior crescimento de *calli* não-morfogénicos por efeito de um aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio, parece estar de acordo com resultados obtidos, também em hipocótilos de linho, por outros autores (46). No sistema utilizado por estes autores, um estímulo (de naturezas várias) seguido da depleção controlada de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio induziu uma resposta morfogénica. Estes resultados, são no entanto contraditórios com os obtidos por outros autores para outras espécies. De facto, tinha sido mostrado que, o aumento na concentração daquele ião afectara positivamente a embriogénese somática a partir de células em suspensão de *Daucus carota* (43), e que não alterara significativamente, numa larga gama de concentrações, a capacidade embriogénica de culturas de outras espécies tais como de embriões zigóticos imaturos de *Triticum aestivum* (37) e de *calli* derivados de embriões zigóticos imaturos de *Hevea brasiliensis* (40). Devido à existência de fortes interacções entre cálcio e citocininas (39), entre cálcio e N inorgânico (40) e entre cálcio, citocininas e N inorgânico (47), não é possível

fazer comparações directas com os referidos trabalhos. Montoro *et al.* (40) justificam, no entanto, um efeito positivo de baixos níveis de cálcio na embriogénese somática pelo facto de aumentar a friabilidade de *calli* compactos, como é o caso dos *calli* de linho nas condições testadas, permitindo desse modo, maior acesso de N exógeno às células, o qual deve ser intenso nas primeiras fases da embriogénese somática.

Apesar do efeito na indução de embriogénese somática, os factores estudados *per se*, ou a sua interacção, não tiveram efeito significativo no número de embriões produzidos nas culturas embriogénicas (fig. IV.3). Dos resultados experimentais obtidos neste trabalho e de algumas evidências descritas pelos autores atrás mencionados, é razoável pensar que uma vez induzido (pelo estímulo hormonal) e iniciado (pelo baixo nível de  $\text{Ca}^{2+}$ ) o processo embriogénico, estes factores, pelo menos na gama de concentrações testadas, não afectem significativamente a frequência de embriões somáticos germinados nos explantes. No entanto, verificou-se que foram necessárias concentrações mais elevadas de ZEA (1,6 mg/l) para garantir um desenvolvimento normal dos embriões produzidos (fig. IV.4).

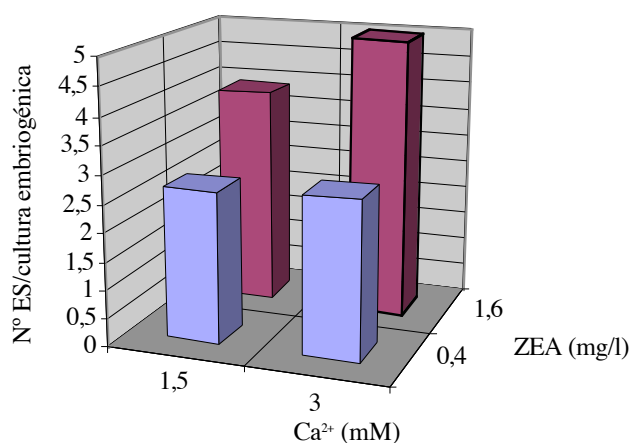


Figura IV.3 – Efeito de diferentes níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e ZEA do meio de cultura no número médio de ES produzidos no final de 5 semanas de cultura. Os 4 tratamentos não dão resultados significativamente diferentes.

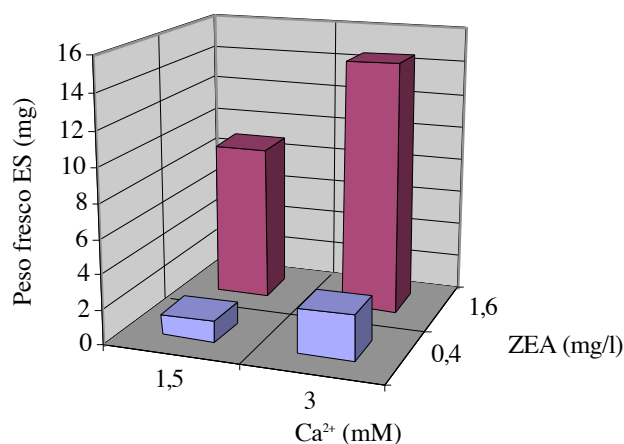


Figura IV.4 – Efeito de diferentes níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e ZEA do meio de cultura no peso fresco médio dos mesmos no final de 5 semanas de cultura.

Não foi possível analisar estatisticamente o efeito dos factores estudados no crescimento dos embriões somáticos devido ao facto de estes, uma vez destacados dos respectivos *calli*, terem sido pesados em conjunto, no entanto, parece ter havido um incremento no peso fresco dos ES quando se duplicou a concentração de cálcio no meio.

A zeatina teve um efeito bem evidente no rendimento embriogénico, tendo-se obtido o valor mais elevado no tratamento com os níveis mais altos de  $\text{Ca}^{2+}$  e ZEA (fig. IV.5). Este resultado leva a supôr que, muito provavelmente haverá espaço para melhorar o rendimento embriogénico através da manipulação dos níveis destes factores no meio de cultura.

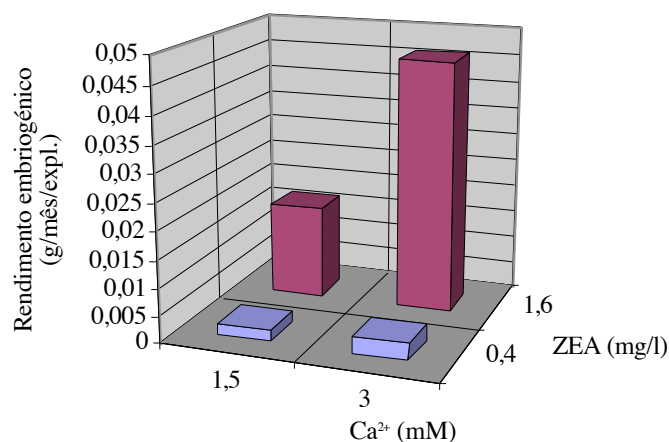


Figura IV.5 – Efeito de diferentes níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e ZEA do meio de cultura no rendimento embriogênico global.

Alguns autores têm sugerido que a iniciação da embriogênese somática envolve um enfraquecimento do gradiente de interação célula-célula que coordena o desenvolvimento bipolar do embrião (10). Na presença de um estímulo contínuo para a divisão mitótica, do tipo citocinina, células que se encontrem ainda relativamente indiferenciadas e que retenham a sua pré-determinação interna para a embriogênese (totipotência), poderão escapar ao controlo global do grupo celular, que constitui o tecido/orgão/embrião diferenciado, e reiniciar a via embriogénica independentemente deste (10). Os resultados obtidos nesta experiência preliminar parecem corroborar esta explicação. Considerando que a concentração de citocinina no meio MS é suficiente para produzir e manter o estímulo mitótico, a indução embriogénica pode acontecer. A baixas concentrações de ZEA, só com a diminuição do nível de  $\text{Ca}^{2+}$ , possivelmente com o consequente enfraquecimento da interação célula-célula, foi possível reverter o processo de crescimento celular indiferenciado para a via embriogénica (figs. IV.1 e IV.2).

### *Conclusões e perspectivas*

Muitos factores tornam o conhecimento do papel específico que determinados compostos têm no crescimento e na diferenciação, uma tarefa laboriosa. A natureza destes factores é ainda muito diversa. Factores inerentes à espécie e ao tipo de tecido utilizado como explante primário podem determinar não apenas diferenças no metabolismo activo (27), mas também no nível das concentrações endógenas de nutrientes e reguladores de crescimento. No caso dos embriões zigóticos, um factor importante é a presença do tecido maternal envolvente (43). Outro aspecto muito importante é a rede multidimensional de inter-relações entre nutrientes e reguladores de crescimento, que restringe a inferência de relações mecanísticas entre estes e o processo embriogénico. Muito provavelmente, só reduzindo a variabilidade total – inerente à presença de tecidos heterogéneos, ao problema da “memória” do meio de cultura anterior, quando se utilizam procedimentos com transferências sucessivas, à utilização de aditivos complexos na formulação dos meios de cultura, entre outros – de modo a gerar um vasto número de experiências com resultados independentes comparáveis, será possível chegar a conclusões mais concretas e rigorosas sobre a função dos factores do meio nos mecanismos subjacentes à indução e expressão da embriogénese somática.

Neste sentido, o conjunto de resultados obtidos nestas experiências poderá ser considerado, não apenas no sentido de servirem de linhas orientadores para o estabelecimento de protocolos de embriogénese somática no linho, mas também como uma contribuição informativa para o conhecimento dos eventuais papéis dos factores estudados naquele processo de desenvolvimento de plantas *in vitro*.

Concretamente, o sistema aqui estudado parece constituir um bom modelo para o estudo:

- metabólico e bioquímico sobre o papel do  $\text{NO}_3^-$  e do  $\text{NH}_4^+$  no crescimento de *callus* vs. embriogénese somática e sua relação com o metabolismo do C; e
- do papel regulador vs. estrutural do  $\text{Ca}^{2+}$  na indução e na predisposição dos tecidos para a embriogénese somática.

## Bibliografia

- 1 **Samoylov** V.M., Tucker D.M. e Parrott W.A. (1998) Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 8-13.
- 2 **Rigano** V.M., Martino C., Vona V., Esposito S. e Rigano C. (1989) Nitrogen nutrition and changes in amino acid pools of *Cyanidium caldarium*. *Phytochemistry* 28(11), 2891-2895.
- 3 **Dussert** S., Verdeil J., Rival A., Noirot M. e Buffard-Morel J. (1995a) Nutrient uptake and growth of in vitro coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. *Plant Sci.* 106, 185-193.
- 4 **George** E.F. *Plant Propagation by Tissue Culture, Part I: The Technology*, Exegetics Limited, Edington, England, 1993, pp. 574.
- 5 **Krikorian** A.D. e Berquam D. (1969) Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Bot. Rev.* 35, 59-88.
- 6 **Blanc** G., Michaux-Ferrière N., Teisson C., Lardet L. e Carron M.P. (1999) Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 59, 103-112.
- 7 **Saunders** J.W. e Tsai C.J. (1999) Production of somatic embryos and shoots from sugarbeet callus: effects of abscisic acid, other growth regulators, nitrogen source, sucrose concentration and genotype. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 35, 18-24.
- 8 **Dussert** S., Verdeil J. e Buffard-Morel J. (1995b) Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. *Plant Sci.* 111, 229-236.
- 9 **Ettiène** H., Lartaud M., Carron M.P. e Michaux-Ferrière N. (1997) Use of calcium to optimize long-term proliferation of embryogenic calluses and plant regeneration of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). *J. Exp. Bot.* 48, 129-137.
- 10 **Pretová** A. e Williams E.G. (1986) Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 126, 155-161.
- 11 **Cunha** A. e Fernandes-Ferreira M. (1996) Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 47, 1-8.
- 12 **Tejavathi** D.H., Sita G.L. e Sunita A.T. (2000) Somatic embryogenesis in flax. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63, 155-159.
- 13 **Canhoto** J.M. e Cruz G.S. (1994) Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa*

- sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30, 21-25.
- 14 **Levi A.** e Sink K.C. (1990) Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus. J. Plant Physiol. 137, 184-189.
- 15 **Konan N.K.**, Sangwan R.S. e Sangwan B.S. (1994) Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Identification of parameters influencing the frequency of embryogenesis. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 37, 91-102.
- 16 **Lou H.** e Kako S. (1995) Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. Scientia Horticulturae 64, 11-20.
- 17 **Li X.Y.**, Huang F.H. Murphy J.B. e Gbur Jr. (1998) Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 34, 22-26.
- 18 **King S.P.** e Kasha K.J. (1994) Optimizing somatic embryogenesis and particle bombardment of barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30, 117-123.
- 19 **Meijer E.G.M.** e Brown D.C.W. (1987) Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 10, 11-19.
- 20 **Shrikhande M.**, Thengane S.R. e Mascarenhas A.F. (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29, 38-42.
- 21 **Loiseau J.**, Marche C. e Le Deunff Y. (1995) Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 41, 267-275.
- 22 **Jeannin G.**, Bronner R. e Hahne G. (1995) Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. Plant Cell Reports 15, 200-204.
- 23 **Lu C.**, Vasil I.K. e Ozias-Akins P. (1982) Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. Theor. Appl. Genet. 62, 109-112.
- 24 **Ladyman J.A.R.** e Girard B. (1992) Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrates sources. Hortscience 27 (2), 164-165.
- 25 **Eapen S.** e George L. (1993) Somatic embryogenesis in peanut: influence of growth regulators and sugars. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 35, 151-156.
- 26 **Nuutila A.M.**, Kurtén U. e Kauppinen V. (1991) Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth.) callus cultures: a statistical approach. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 24, 73-77.



- 27 **Kochba J.**, Spiegel-Roy P., Neumann H. e Saad S. (1982) Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 105, 359-368.
- 28 **Oksman-Caldentey K.M.**, Sevón N., Vanhala L. e Hiltunen R. (1994) Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 38, 263-272.
- 29 **Horn M.E.** e Widholm J.M. (1994) Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture IV. Free amino acid pools and effect of nitrogen on chlorophyll levels. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 39, 245-250.
- 30 **Gamborg O.L.**, Miller R.A. e Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- 31 **Rangaswamy N.S.** (1986) Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. *Proc. Indian Acad. Sci. Plant Sci.* 96 (4), 247-271.
- 32 **Halperin W.** e Wetherell D.F. (1965) Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature* 205, 519-520.
- 33 **Wetherell D.F.** e Dougall D.K. (1976) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37, 97-103.
- 34 **Elkonin L.A.** e Pakhomova N.V. (2000) Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 61, 115-123.
- 35 **Kamada H.** e Harada H. (1979) Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 91, 453-463.
- 36 **Walker K.A.** e Sato S.J. (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion on somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 1, 109-121.
- 37 **He D.G.**, Yang Y.M. e Scott K.J. (1989) The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 64, 251-258.
- 38 **Tremblay L.** e Tremblay F.M. (1991) Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Sci.* 77, 233-242.
- 39 **Hepler P.K.** e Wayne R.O. (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 397-439.
- 40 **Montoro P.**, Etienne H. e Carron M.P. (1995) Relation between nitrogen uptake, amino acid contents, and embryogenic intensity of rubber tree calli. *Journal of Plant Nutrition* 18(8), 1693-1704.

- 41 **Bowler** C. e Fluhr R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 241-246.
- 42 **Arruda** S.C.C., Souza G.M., Almeida M. e Gonçalves A.N. (2000) Anatomical and biochemical characterization of calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 63, 143-154.
- 43 **Timmers** A.C.J., Reiss H.-D., Bohsung J., Traxel K. e Schel J.H.N. (1996) Localization of calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *Protoplasma* 190, 107-118.
- 44 **Jansen** M.A.K., Booij H., Schel J.H.N. e de Vries S.C. (1990) Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9, 221-223.
- 45 **Veisseire** P., Linossier L. e Coudret A. (1994) Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 39, 219-223.
- 46 **Verdus** M.C., Thellier M. e Ripoll C. (1997) Storage environmental signals in flax. Their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium. *The Plant Journal* 12(6), 1399-1410.
- 47 **Misra** P. e Chaturvedi H.C. (1991) Influence of inorganic salts on cytokinin induced caulogenesis in leaf segments of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Sci.* 79, 229-235.

# V

---

## *Variações dos Lípidos Totais e das Fracções Neutra e Ácida Durante a Embriogénese Somática de Linho (Linum usitatissimum L.):*

### *I – Variação Ontogénica dos Teores e Composição das Fracções de Ácidos Gordos Livres e Esterificados.*

*O trabalho descrito neste capítulo conduziu ao manuscrito:*

“Ontogenic Variations in Free and Sterified Fatty Acids During Somatic Embryogenesis of Flax (*Linum usitatissimum* L.)”.

Cunha A. e Fernandes-Ferreira M. (2001)

## Resumo

Com o trabalho que se descreve aqui e no capítulo seguinte pretendeu-se dar uma contribuição para o estudo da ontogénese química associada à indução e desenvolvimento de embriões somáticos e ao crescimento de *calli* embriogénicos e não-embriogénicos, utilizando como modelo experimental *Linum usitatissimum* uma vez que as culturas *in vitro* desta espécie, incluindo a embriogénese somática, são processos bem estabelecidos no nosso laboratório. A embriogénese somática foi induzida a partir de segmentos de hipocótilo de plântulas de linho germinadas *in vitro*, em meio embriogénico anteriormente descrito (MS5; Capítulo II). Ao longo de um ciclo de cultura foram realizadas 4 amostragens:  $t_0$  – no início da cultura;  $t_1$  – ao fim de 2 semanas;  $t_2$  – ao fim de 5 semanas; e  $t_3$  – ao fim de 7 semanas. Inerente aos próprios processos de desdiferenciação e diferenciação de tecidos em estudo, a natureza das culturas amostradas variou no tempo, desde segmentos de tecido de hipocótilo (SH) em  $t_0$  ou com desenvolvimento incipiente de *callus* (SHC) em  $t_1$ , a *calli* não-embriogénicos (CNE), *calli* embriogénicos (CE) e respectivos embriões somáticos (ES) em  $t_2$  e  $t_3$ . De cada uma das amostras foram obtidos extractos lipídicos totais, tendo estes sido posteriormente fraccionados, por extracção líquido/líquido, nas fracções ácida e neutra. Os ácidos gordos livres (presentes na fracção ácida) e os ácidos gordos esterificados (presentes na fracção neutra) foram derivatizados por metilação e os ésteres metílicos obtidos analisados por GC e GC-MS. Durante a desdiferenciação de tecidos dos explantes SH e o consequente crescimento de *calli*, foi observada uma diminuição da percentagem de lípidos totais, das fracções neutra e ácida. Associada ao desenvolvimento de ES, apenas se verificou uma diminuição significativa nos lípidos neutros. Dum modo geral, houve um aumento muito significativo do teor em ácidos gordos livres e esterificados com a desdiferenciação e crescimento exponencial de *calli*, para níveis que se mantiveram nas fases mais tardias do ciclo. Os ácidos gordos insaturados constituíram a maior parte do teor de ácidos gordos livres totais nos *calli* e ES (56 – 72 %). Os ácidos gordos livres mais representados em todas as amostras foram os que constituem produtos da síntese *de novo* – 16:0, 18:0 e 18:1 – e os polinsaturados 18:2 e 18:3. No entanto, na fracção dos ácidos gordos esterificados, encontrou-se maior diversidade nos ácidos gordos maioritários, sendo 12:0 o mais representado em SH. Um resultado importante foi a ocorrência de variação ontogénica dos ácidos gordos associada à desdiferenciação e crescimento de *calli* não-

embriogénicos, à embriogénese somática e ao desenvolvimento de embriões somáticos sendo que, quer para os ácidos gordos livres quer para os esterificados, o padrão de variação foi dependente do composto em questão. Foram encontrados ácidos gordos específicos de determinadas amostras ou predominantes em determinados tecidos. Por exemplo, 17:0 na forma esterificada, só ocorreu em ESt<sub>2</sub> e 16:1 predominava em ESt<sub>3</sub>. A existência de potenciais marcadores bioquímicos da capacidade autotrófica dos embriões somáticos e da capacidade embriogénica dos *calli* é discutida neste capítulo. Estes resultados mostraram que este modelo de culturas *in vitro* pode dar um contributo importante ao estudo do metabolismo dos lípidos em geral e, em particular, de alguns ácidos gordos menos comuns.

## Introdução

Os lípidos, constituintes fundamentais de todos os organismos, e designadamente das plantas, representam apenas uma pequena proporção da biomassa (*ca.* 6 %) desempenhando, no entanto, vários papéis fundamentais:

- São acumulados em muitos tecidos onde actuam como eficientes reservas energéticas (geralmente na forma de triglicerídeos);
- São os principais constituintes estruturais das membranas formando a bicamada lipídica;
- Como componentes das cutículas, cutina e ceras epicuticulares, que revestem as partes aéreas das plantas, e da suberina nas raízes;
- Como importantes moléculas biológicas na “transdução” de sinais celulares associadas, dum modo geral, a respostas a stresses (lípidos inositóis e produtos da via da lipoxigenase do ácido linolénico tal como o jasmonato) (1, 2); e
- Podem entrar na regulação de vários processos celulares via acilação de proteínas por ácidos gordos (3).

Por consequência não é difícil acreditar que variações nos lípidos estejam envolvidas nas diferentes fases da vida das plantas tais como a germinação, o crescimento, o desenvolvimento e a senescência. Perceber no entanto, o papel dos diferentes lípidos nos vários momentos, só será conseguido em maior extensão, com o auxílio da manipulação génica de plantas. Estudos com mutantes de *Arabidopsis* (4), com maior proporção de estearato nos lípidos de membrana relativamente ao fenótipo selvagem, mostraram que esta alteração teve um efeito dramático no desenvolvimento das plantas, levando ao aparecimento de um fenótipo miniatura (5). Plantas transgénicas onde a sobreexpressão do gene FAE1 (cujo transcripto é responsável pela elongação de ácidos gordos de cadeia longa) levou a uma acumulação dos ácidos 20:0 e 22:0 nos glicerolípidos de membrana, apresentaram uma morfologia externa e uma estrutura dos cloroplastos significativamente alteradas (6). Mas nem sempre uma alteração génica introduzida tem a resposta prevista. Um mutante triplo de *Arabidopsis* que não possui

18:3<sup>Δ9,12,15</sup> nem 16:3<sup>Δ7,10,13</sup> (ácidos gordos importantes para anular o potente efeito oxidante dos radicais livres, produzidos pelas reacções claras da fotossíntese, sobre as membranas dos tilacóides) exibiu uma fotossíntese e crescimento normais (7).

Para além da composição lipídica ser controlada por factores genéticos e ambientais (8, 9), a biossíntese respectiva é ainda regulada por processos associados ao desenvolvimento das plantas (9). Muito conhecimento sobre a biossíntese de lípidos, nomeadamente sobre as vias bioquímicas e enzimas associadas, tem sido acumulado nos últimos anos (1). No entanto, ainda pouco se sabe sobre a regulação da sua biossíntese, nas diferentes fases do desenvolvimento. Diferentes abordagens ao estudo do controlo de vias metabólicas em plantas são possíveis (10). A monitorização das alterações que ocorrem naturalmente no metabolismo lipídico durante um processo de desenvolvimento, tal como a embriogénese somática, pode trazer informações importantes sobre aquela regulação.

### *1 – A embriogénese somática e o linho como modelos experimentais para o estudo do metabolismo dos lípidos*

A embriogénese somática induzida a partir de espécies com sementes ricas em óleo, como é o caso do linho, apresenta várias vantagens para o estudo em questão:

- sendo um processo de desenvolvimento vegetal complexo, oferece a possibilidade de se poderem projectar estudos do metabolismo mais dirigidos (bioquímicos) ou mais integrados (fisiológicos);
- tendo um modelo análogo bem estudado - a embriogénese zigótica - em termos de ontogénese, quer estrutural, quer química, torna-se, à priori, um modelo mais previsível;
- As sementes em germinação são tradicionalmente utilizadas no estudo do metabolismo lipídico e, sendo o modelo somático um modelo semelhante ao zigótico, não tem os constrangimentos sazonais, de quantidade de material disponível e culturais (ex: a manipulação de embriões (2)) que este apresenta; por outro lado,
- porque é um processo que se desenrola em condições *in vitro*, é controlável e reprodutível, o que permite com bastante rigor, manipulando as condições do meio, estudar as diferentes vias metabólicas potencialmente activas.

O linho sendo uma espécie cultivada, de elevado interesse pelo seu óleo e pela sua fibra, apresenta já uma história importante no que diz respeito ao estudo e composição dos seus lípidos de reserva (11, 12, 13). A acumulação de reservas nos embriões zigóticos de linho, maioritariamente de natureza lipídica, varia significativamente com o seu desenvolvimento ontogénico. A acumulação começa geralmente ao 8-10º dia e ao 14º já contém 40 % das reservas totais. Sabe-se que a acumulação se mantém em condições *in vitro* mas a taxa de acumulação é menor que a observada *in situ* (14). *In situ*, a acumulação de lípidos é exponencial nos primeiros 30 dias (DAA), sendo os triglicerídeos (TAG) os lípidos responsáveis por aquela variação, e 18:2, o ácido gordo mais abundante (13). No modelo desenvolvido para o linho, para além de se poder seguir o desenvolvimento de embriões somáticos *in vitro*, a existência de linhas de *calli* com capacidades embriogénicas diferentes – *calli* embriogénicos e *calli* não-embriogénicos - permite ainda o estudo do metabolismo dos lípidos em *calli* com ou sem diferenciação de tecidos (embriogénese). As culturas embriogénicas têm também, potencialmente, um forte impacto ao nível da produção de metabolitos típicos das respectivas plantas. A maior parte dos óleos usados comercialmente, na indústria alimentar e noutras, é de origem vegetal. As culturas de tecidos e células embriogénicas, com capacidade de se propagarem e produzirem grandes quantidades de biomassa (células e embriões) podem funcionar como fontes contínuas de metabolitos de interesse, com menos recursos humanos e técnicos.

Os constituintes lipídicos mais importantes nas plantas são os compostos acil, i.e., compostos que contêm moléculas de ácidos gordos. Por conseguinte, a biossíntese destes lípidos pode ser dividida em duas partes – a formação dos ácidos gordos propriamente ditos e a montagem dos lípidos acil mais complexos (1). Como este trabalho se baseou essencialmente na ontogénese dos ácidos gordos, torna-se pertinente fazer uma súmula dos aspectos mais relevantes do seu metabolismo nas plantas.

## 2 – Metabolismo dos ácidos gordos nas plantas

### 2.1 – Síntese de ácidos gordos

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos com uma cadeia carbonada altamente reduzida (3). Tipicamente, os ácidos gordos encontrados nas membranas das plantas contêm 16



ou 18 átomos de carbono com 1 a 3 ligações duplas *cis*. Em termos genéricos, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) linoleico ( $18:2^{\Delta 9,12}$ ) e  $\alpha$ -linolénico ( $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) são os maioritários, representado conjuntamente cerca de 80 % do total dos ácidos gordos na maior parte dos tecidos vegetais (15). Para além destes, algumas plantas produzem ainda ácidos gordos com 8 a 32 átomos de carbono que geralmente acumulam em lípidos de reserva ou em ceras epicuticulares (3). Nas ceras acumulam-se essencialmente ácidos gordos de cadeia muito longa ( $>18$  C).

Nas plantas que acumulam lípidos como principal reserva, a biossíntese de ácidos gordos e sua incorporação em lípidos mais complexos envolve vários compartimentos subcelulares: os plastídeos, o citosol e o retículo endoplasmático (RE) (fig. V.1).

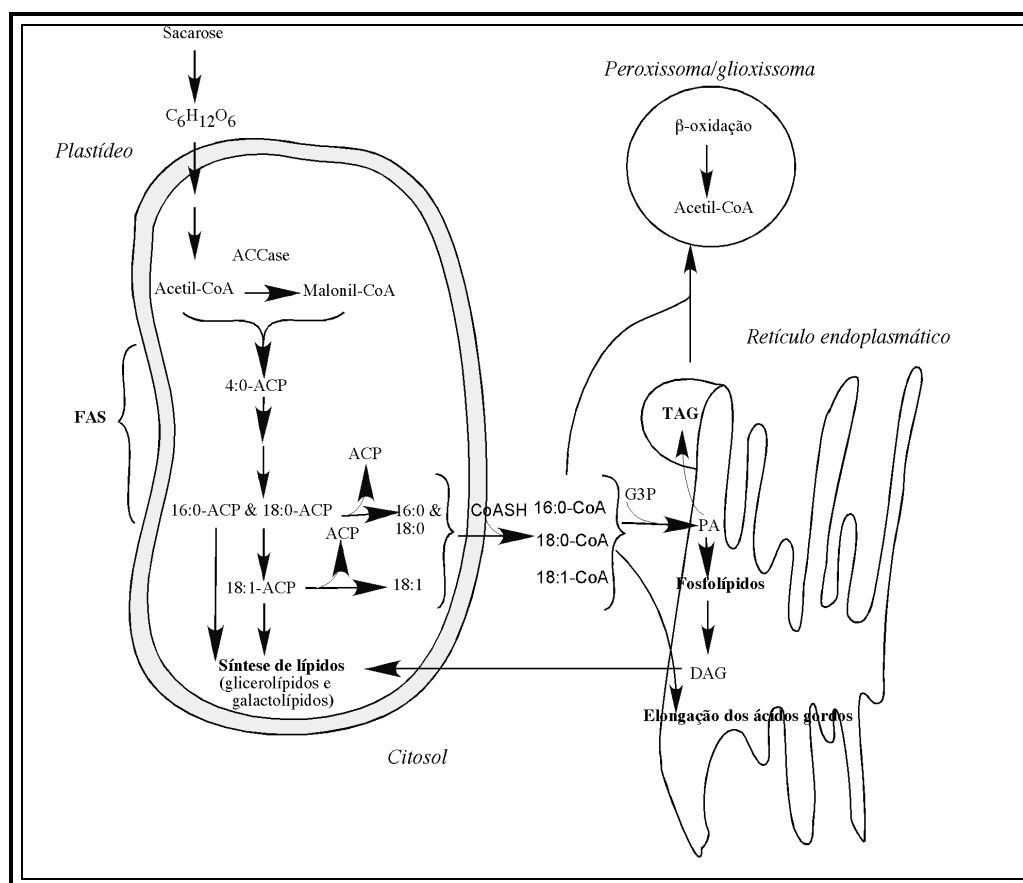


Figura V.1 – A biossíntese e o metabolismo dos lípidos tem lugar em vários organelos e, nalguns casos, envolve o movimento de precursores, intermediários e lípidos de uns compartimentos para outros [adaptado de Somerville *et al.* 2000 (3)]. ACCase - Acetil-CoA-carboxilase; ACP - Proteína transportadora de grupos acil; CoA- - Coenzima A ligada a ácido gordo; CoASH - Coenzima A livre (grupo sulfidrilo livre); DAG - Diacilglicerol; FAS - Sintetases dos ácidos gordos; G3P - Glicerol-3 fosfato; PA - Ácido fosfatídico; TAG - Triacilglicerídeos.

### 2.1.1 – Síntese de novo (FAS)

A síntese *de novo* de ácidos gordos, que em último depende da sacarose fotoassimilada, depende directamente da actividade das enzimas acetil-CoA-carboxilase (ACCase) e sintetases dos ácidos gordos (FAS) (1) (fig. V.1). O nome FAS refere-se a um complexo de várias enzimas individuais que catalizam a conversão de acetil-CoA e malonil-CoA nos ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0) nos plastídeos (geralmente cloroplastos) (3). Uma outra enzima cloroplastideal solúvel, muito activa, é a  $\Delta^9$ -estearil-ACP desaturase que remove átomos de hidrogénio aos átomos de carbono 9 e 10 do estearato produzindo oleato (18:1 $\Delta^9$ ), um ácido insaturado com uma ligação dupla *cis*. Tipicamente a síntese de ácidos gordos termina com a hidrólise do grupo acil da ACP através duma tioesterase (enzima que pertence ao grupo mais genérico das hidrolases), ou com a transferência do grupo acil directamente para um glicerolípido através duma aciltransferase plastideal (3) (fig. V.1). Nas plantas, as tioesterases principais pertencem à classe FatA, que são mais activas com o 18:1 $\Delta^9$ -ACP; a classe FatB, representada pela 16:0-ACP tioesterase, é mais activa com os acil-ACPs saturados de cadeia mais curta. A quebra da ligação ACP pelas acil-ACP hidrolases, compromete o ácido gordo para exportação do plastídeo por um mecanismo ainda desconhecido (3). Os ácidos gordos exportados são convertidos em acil-CoAs via acção catalítica da acil-CoA sintetase que está associada à membrana externa dos plastídeos (2) (fig. V.1). Os produtos principais da síntese *de novo* (palmitato e oleato) podem, posteriormente, ser modificados por desaturação ou elongação, ser directamente utilizados na síntese de lípidos de reserva, ou ser processados por  $\beta$ -oxidação (2). A figura V.2 traduz esquematicamente a síntese *de novo* e os destinos possíveis dos ácidos gordos.

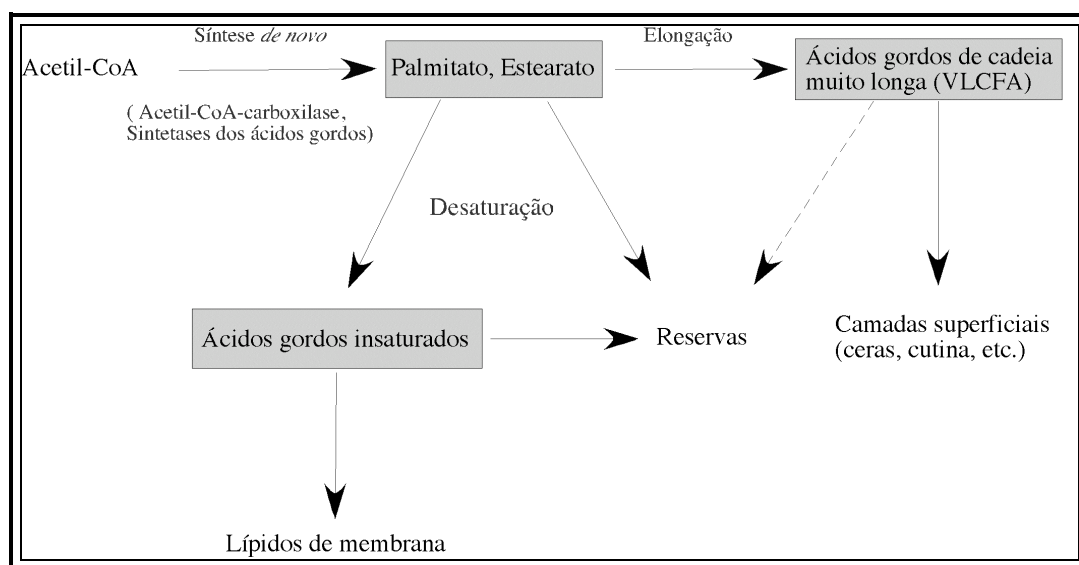


Figura V.2 – Esquema simplificado da síntese e destinos principais de ácidos gordos em plantas. Adaptado de Weselake 2000 (2).

### 2.1.2 – Desaturação dos ácidos gordos

A introdução de ligações duplas *cis* nos ácidos gordos reveste-se de uma importância capital para a sobrevivência das plantas. Se as membranas contivessem apenas ácidos gordos saturados ou *trans*-insaturados, as caudas hidrofóbicas formariam um gel semicristalino, alterando a permeabilidade e interferindo com a mobilidade dos componentes de membrana. Em contraste, as ligações duplas *cis*, que introduzem torções angulares na cadeia, podem aumentar a fluidez da membrana diminuindo dramaticamente a temperatura de fusão daquelas matrizes ordenadas (3). As principais desaturações que ocorrem em plantas são as  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$ , que transformam o oleato em linoleato ou em  $\alpha$ -linolenato quando ocorre apenas a primeira desaturação ou ambas, respectivamente. Estas desaturases, ao contrário das reacções parciais FAS e da  $\Delta^9$ -estearil-ACP desaturase que usam como substratos acil-tioésteres (acil-ACP ou acil-CoA), são proteínas integrais de membrana e utilizam, como substratos, lípidos complexos (3).

### 2.1.3 – Elongação dos ácidos gordos (FAE)

As plantas, bem como a maior parte dos outros organismos eucariotas, possuem um sistema de elongases que catalisam a extensão de ácidos gordos com um número de átomos de carbono  $\geq 18$ , produzindo ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCFA). As reacções de extensão ou elongação, têm características comuns às reacções FAS, levando à produção de ácidos gordos de cadeia par. Cada ciclo, caracteriza-se por quatro reacções enzimáticas: a adição de 2 átomos de carbono do malonil-CoA a um precursor acil, seguida pela redução, desidratação e uma redução final, tal como nas reacções FAS. No entanto, no caso das reacções de elongação, os substratos são compostos acil-CoA (a ACP não está envolvida no processo) e as elongases estão localizadas no citosol ligadas a membranas tais como as do RE (3). Uma das principais funções da elongação em células epidérmicas é produzir VLCFA saturados, componentes ou precursores dos constituintes do revestimento das partes aéreas das plantas (fig. V.2). Algumas sementes produzem também VLCFA a partir do ácido oleico e, portanto, estes ácidos gordos são monoinsaturados (2).

### 2.1.4 – Síntese de ácidos gordos de cadeia ímpar

A vasta maioria dos ácidos gordos é de cadeia par, devendo-se este facto à própria natureza do processo de síntese ou elongação. Embora em quantidades muito baixas encontram-se, por vezes, nos tecidos vegetais ácidos gordos de cadeia ímpar. A  $\alpha$ -oxidação é um sistema catabólico onde a descarboxilação peroxidativa de um ácido gordo  $C_n$ , na presença de  $H_2O_2$  e  $NAD^+$ , leva à formação de  $CO_2$ ,  $NADH_2$  e do ácido  $C_{n-1}$  correspondente. Este sistema oxidativo, parece ser específico de sementes em germinação visto as enzimas necessárias se encontrarem na fracção mitocondrial, microssomal e citoplasmática dos respectivos tecidos (16). Alguns autores consideram porém, que a  $\alpha$ -oxidação possa ocorrer também em tecidos foliares embora em menor extensão (17). Este processo oxidativo poderia assim explicar a presença de ácidos gordos de cadeia ímpar no tecidos vegetais.

## 2.2 – Lípidos de membranas

Os principais lípidos acil das plantas são os fosfoglicerídeos e os glicosilglicerídeos, que integram as membranas, e os triacilglicerídeos (TAG) que são lípidos de reserva (1).

Em 1979, Roughan e Slack (18) propuseram a existência de duas vias distintas para a biossíntese de lípidos de membrana em plantas superiores – a procariota e a eucariota. O diagrama abreviado representado na figura V.1, refere-se às duas vias de biossíntese de glicerolípidos em folhas de *Arabidopsis*. A via procariota refere-se à biossíntese de lípidos nos plastídeos e a eucariota refere-se a uma sequência de reacções envolvidas na biossíntese de lípidos no RE, na transferência de alguns lípidos entre o RE e os plastídeos e em modificações posteriores dos lípidos nos plastídeos (3). Os produtos FAS (16:0-, 18:0- e 18:1<sup>Δ9</sup>-ACP) podem ser incorporados directamente nos lípidos dos plastídeos pela via procariota, ou exportados para o citoplasma como ésteres de CoA, os quais serão posteriormente incorporados nos lípidos do RE por aciltransferases da via eucariota (fig. V.1).

Os primeiros passos na síntese de glicerolípidos são duas reacções de acilação que transferem ácidos gordos de acil-ACP (nos plastídeos) ou acil-CoA (no citosol) para o glicerol-3-fosfato (G3P) para formar ácido fosfatídico (PA) (fig. V.1). Devido à especificidade de substratos das aciltransferases plastideais, os PA produzidos pelas vias procariota e eucariota são de diferente composição quanto aos grupos acil. O PA produzido pela via procariota tem 16:0 na posição *sn*-2 e, geralmente, 18:1<sup>Δ9</sup> na posição *sn*-1; o PA produzido pela via eucariota (através das aciltransferases do RE) é caracteristicamente enriquecido em ácidos C18, estando o 16:0, quando presente, confinado à posição *sn*-1. É através da via procariota que se produzem a maior parte dos lípidos do cloroplasto: o fosfolípido fosfatidilglicerol (PG), que constitui menos de 16 % dos glicerolípidos, e os galactolípidos monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG), que são os lípidos maioritários, e o sulfolípido sulfoquinovosildiacilglicerol (SDG). O PA derivado do RE dá origem a fosfolípidos tais como, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserina (PS), que são característicos das várias membranas eucariotas externas ao cloroplasto (3). A via eucariota é a principal via utilizada para a síntese de glicerolípidos nos tecidos não fotossintéticos mas também em tecidos fotossintéticos de

muitas plantas superiores. A quantidade relativa de glicerolípidos sintetizados no cloroplasto e no RE varia nos diferentes tecidos e nas diferentes espécies.

### 2.3 – Lípidos de reserva

As plantas acumulam material de reserva (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) nas suas sementes de modo a assegurar o crescimento da geração seguinte (19). Nas sementes e no pólen, as reservas são acumuladas mais como ácidos gordos do que como hidratos de carbono ou proteínas de modo a maximizar a quantidade de energia por unidade de volume (20). Porque os ácidos gordos são moléculas orgânicas substancialmente mais reduzidas, a sua oxidação tem um maior potencial para a produção de energia. Naquelas estruturas, essencialmente disseminativas, a dimensão é um parâmetro de importância capital. Contrariamente, a compactação de reservas energéticas em raízes ou tubérculos não é um factor determinante, pelo que, poucas espécies acumulam quantidades significativas de lípidos nestes órgãos. A quantidade de lípidos de reserva nas diferentes espécies varia bastante, podendo variar de 1 até 60 % da biomassa da semente, mas em quase todas as espécies, a forma química na qual os ácidos gordos são armazenados é o TAG (19).

A mobilização dos lípidos de reserva acumulados é essencial para fornecer carbono e energia para o desenvolvimento das estruturas resultantes da germinação: o embrião, no caso das sementes, ou o tubo polínico nos grãos de pólen. Esta mobilização é realizada por enzimas lipolíticas que libertam os ácidos gordos e posteriormente pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos livres. A acetil-CoA produzida pela oxidação dos ácidos gordos inicia uma nova série de reacções que levam à produção de energia e de intermediários carbonados via ciclo do glioxilato e subsequente gluconeogénese (21). Este sistema de oxidação de ácidos gordos, em sementes acumuladoras de lípidos, funciona nos glioxissomas, mas em tecidos não acumuladores, existem evidências de que ocorre nos peroxissomas (15). Devido à importância metabólica dos lípidos nas sementes e no crescimento dos embriões, as alterações ocorridas nos lípidos de reserva durante a embriogénese somática têm sido objecto de muitos estudos (20, 22, 23, 24, 25). Os TAG são os lípidos de reserva mais comumente encontrados nas sementes, frutos e grãos de pólen, no entanto, há plantas, nomeadamente a jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider), que acumulam ceras (ésteres de *n*-alcoóis e ácidos gordos) como

reserva energética (3). Embora os TAG sejam geralmente constituídos pelos ácidos gordos mais comuns, i.e., derivados da actividade FAS, algumas espécies ou famílias de plantas acumulam outro tipo de ácidos gordos nos lípidos de reserva, designadamente, MCFA (23, 27), VLCFA, ácidos hidroxilados, ácidos epoxi, ácidos com ligações duplas em posições pouco comuns ou com ligações triplas, ácidos com anéis aromáticos, etc. Muitos destes ácidos, nomeadamente o ácido láurico (12:0), o erúcico (22:1<sup>Δ13</sup>), o ricinoleico (12-OH, 18:1<sup>Δ9</sup>) são de elevada importância económica (3). Muita da investigação relacionada com ácidos gordos pouco comuns tem estado focalizada na identificação de novas estruturas ou na catalogação da composição de ácidos gordos encontrados nas diferentes espécies. Sobre os mecanismos responsáveis pela biossíntese e acumulação destes compostos, ou sobre o seu significado adaptativo para as plantas que os acumulam, pouco é ainda conhecido (3). O óleo das sementes de linho, óleo de linhaça, essencialmente rico em ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>), é composto também por 12:0, 16:1, 22:0 e 22:1 (11).

### *3 – Crescimento e embriogénese: produção de lípidos*

No contexto da biossíntese de lípidos em plantas, existem basicamente duas situações onde esta ocorre a taxas muito elevadas. Durante a expansão rápida de folhas, onde os lípidos estruturais das membranas plasmática e outras biomembranas celulares têm de ser adicionados rapidamente, e durante a acumulação de reservas em sementes e frutos em maturação (1). Aqueles dois momentos referem-se, naturalmente, ao desenvolvimento de plantas em condições *in vivo*. Em condições *in vitro*, o padrão normal de desenvolvimento vegetal está alterado. No caso estudado, passa pela produção de *callus* a partir de tecido somático jovem (segmentos de hipocótilo) e, posteriormente, pela produção de embriões somáticos a partir de *callus* embriogénico. No que diz respeito aos momentos onde a taxa de biossíntese de lípidos é significativamente mais elevada pode, contudo, fazer-se um paralelo entre o sistema *in vivo* e o sistema *in vitro*. A rápida expansão de folhas com uma elevada exigência em lípidos para a biogénese de membranas pode ser funcionalmente comparável ao crescimento exponencial das células nos *calli*; e, a acumulação de lípidos de reserva em estruturas de suporte ao futuro desenvolvimento dos embriões zigóticos, pode ser comparável à acumulação de lípidos em tecidos embriogénicos (28, 29) ou nos

cotilédones dos embriões somáticos (24, 30). Sabe-se que os TAG aumentam com o início da embriogénese somática e que os embriões somáticos se caracterizam por uma elevada capacidade para a síntese de lípidos (5). Para fazer face a estes aumentos drásticos da biossíntese de lípidos e à sua posterior diminuição noutras fases, o metabolismo tem de ser finamente regulado (1). Pode então partir-se do pressuposto que, alterações no metabolismo lipídico subjacentes aos processos de desenvolvimento e crescimento estudados, se traduzem em alterações mensuráveis nos conteúdos e composição de fracções lipídicas.

O estudo dos ácidos gordos livres e esterificados teve como objectivo principal:

- conhecer a **evolução ontogénica** desta classe de compostos associada à **embriogénese somática** (perspectiva vertical); e
- conhecer e **comparar** a sua **composição específica** nos diferentes tecidos, designadamente *calli* embriogénicos, *calli* não-embriogénicos e embriões somáticos (perspectiva horizontal).



## Material e Métodos

### *I – Considerações prévias*

Alguns factores associados às culturas são determinantes para a qualidade das respostas obtidas e, portanto, alguns requisitos devem ser tomados em consideração no estudo de um processo de ontogénese química associada à evolução de um processo morfogénico *in vitro*. No caso presente, os factores considerados mais relevantes foram: a) o tipo de material vegetal e a sua resposta ao estímulo embriogénico; b) os efeitos da assincronia do processo embriogénico e; c) efeitos de alguns constituintes do meio de cultura, na variabilidade química das amostras.

A selecção do material vegetal teve como critérios a **homogeneidade** e a **idade** do tecido e, portanto, a capacidade de desdiferenciação; a **eficiência embriogénica**; e a **reprodutibilidade** da resposta embriogénica no sentido de reduzir a variabilidade. De experiências anteriores (Capítulos II e III) sabia-se que segmentos sub-cotiledonares (SH) excisados de plântulas de linho até 3 semanas de idade pareciam preencher estes requisitos.

A heterogeneidade da população dos embriões produzidos foi considerado um problema fundamental, apontado como estando na origem do reduzido número de estudos bioquímicos relacionados com a embriogénese somática (31). No nosso sistema estes problemas podem ser potencialmente relevantes nas populações de embriões somáticos e nas populações de *calli* aparentemente não-embriogénicos devido à assincronia do processo embriogénico (ver figs. II.6).

A composição em ácidos gordos é ainda dependente do modo de fornecimento do carbono e energia nas culturas de células e tecidos (32). No nosso caso, e assumindo que os embriões somáticos jovens são nutricionalmente dependentes do *callus* embriogénico, aquela fonte de variabilidade foi grandemente reduzida quando se utilizou apenas uma condição experimental – as culturas foram mantidas na presença de um açúcar como fonte de carbono e energia (2 % de sacarose). Vários exemplos foram

também encontrados na literatura sobre o efeito dos reguladores de crescimento, adicionados aos meios de cultura, na variabilidade química, nomeadamente no que diz respeito à composição em ácidos gordos, encontrada nos tecidos cultivados *in vitro* (33, 34). Neste ensaio utilizou-se apenas uma combinação hormonal, sem se proceder a transferências de tecidos ou a alterações das condições ambientais. Daqui se pode deduzir que embora os resultados não possam ser directamente extrapoláveis para outras condições experimentais, as comparações horizontais e verticais, dentro do modelo estudado, são possíveis.

## *2 – Explantes primários, meio de cultura e condições de crescimento*

Os explantes utilizados neste ensaio foram obtidos, preparados e inoculados como se descreveu no capítulo precedente. As condições de crescimento em câmara de culturas encontram-se definidas na Tabela V.1.

Tabela V.1 – Condições de crescimento das culturas em câmara de ambiente controlado.

Temperatura	24 °C (constante)
Fotoperíodo	16 horas
Intensidade luminosa	$\approx 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Período experimental	7 semanas

## *3 – Amostragem e descrição do material vegetal usado no estudo da componente lipídica*

O material vegetal foi sujeito a amostragens no tempo zero ( $t_0$ ), ao fim de 2 ( $t_1$ ), 5 ( $t_2$ ) e 7 ( $t_3$ ) semanas, em duplicado, a partir de 33 a 63 culturas seleccionadas aleatoriamente. Ao longo do período experimental a natureza do material vegetal recolhido foi obviamente variando. O tipo e a quantidade de material vegetal recolhido em cada amostragem encontra-se descrito na Tabela V.2.

Tabela V.2 – Descrição do tipo de material recolhido em cada amostragem e quantidade utilizada no estudo da componente lipídica.

Amostragem	Tipo de material	População da amostra (unidades por duplicado)
$t_0$	Segmentos de hipocótilo (SH)	48-51
$t_1$	SH com crescimento de <i>callus</i> nas extremidades (SHC)	42
$t_2$	<i>Callus</i> não-embriogénico (CNE)	7
	<i>Callus</i> embriogénico (CE)	27-28
	Embriões somáticos (ES)	112-138
$t_3$	<i>Callus</i> não-embriogénico (CNE)	7-8
	<i>Callus</i> embriogénico (CE)	24
	Embriões somáticos (ES)	110-117

Como se pode ver pela Tabela V.2, nas culturas amostradas em  $t_2$  e  $t_3$  podemos distinguir *calli* não-embriogénicos (CNE), *calli* embriogénicos (CE) e respectivos embriões somáticos (ES). Todas as amostras foram pesadas e conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Embora com a mesma designação em  $t_2$  e  $t_3$ , interessa referir que, em rigor, ao fim de 5 semanas ( $t_2$ ), devido à assincronia do aparecimento dos embriões somáticos nos *calli* embriogénicos, os CNE podem considerar-se apenas aparentemente não-embriogénicos (sem embriões visíveis). Como já foi referido no capítulo II, a percentagem máxima de indução de embriões somáticos só é atingida ao fim de 6-7 semanas. No entanto, como ao fim de 5 semanas ( $t_2$ ), aquela variável já se encontra muito próximo do seu valor máximo (ver figs. II.6) e como as características dos *calli* embriogénicos e não-embriogénicos em  $t_2$ , do ponto de vista dos constituintes metabólicos analisados, se revelaram significativamente diferentes, considerou-se que uma potencial presença de *calli* embriogénicos na amostra de CNE não teve um peso significativo nos resultados. Embora em ambas as amostragens,  $t_2$  e  $t_3$ , os embriões somáticos se encontrassem numa fase pós-cotiledonar, os seus estados de desenvolvimento eram bastante diferentes. Enquanto os  $\text{ESt}_2$  apresentavam apenas os cotilédones ou um par de folhas, os  $\text{ESt}_3$  eram, na realidade, pequenas plântulas com vários caules, cada um deles com um ou mais pares de folhas.

#### 4 – Extracção e análise da componente lipídica

##### 4.1 – Extracção de lípidos totais e obtenção das fracções neutra e ácida

Os extractos lipídicos foram obtidos, segundo método descrito na secção M&M do capítulo III. Os extractos foram pesados em balança analítica após evaporação do solvente até peso constante e posteriormente redissolvidos num volume de 4 ml de *n*-hexano. Um volume conhecido de extracto lipídico foi sujeito a partição sequencial entre *n*-hexano e uma solução propanol:água (72:56 ml), tendo-se obtido duas fases orgânicas. Na primeira partição com a fase alcoólica, a pH 12, obteve-se a fracção neutra (N), e na segunda, após acidificação da fase alcoólica para pH 3, obteve-se a fracção ácida (A) onde se encontravam os ácidos gordos livres presentes nos tecidos. O procedimento foi adaptado do método descrito por Fernandes-Ferreira (35) encontrando-se esquematizado na fig. V.3. Estas fracções N e A foram igualmente evaporadas até peso constante, pesadas e redissolvidas em 4 ml de *n*-hexano.

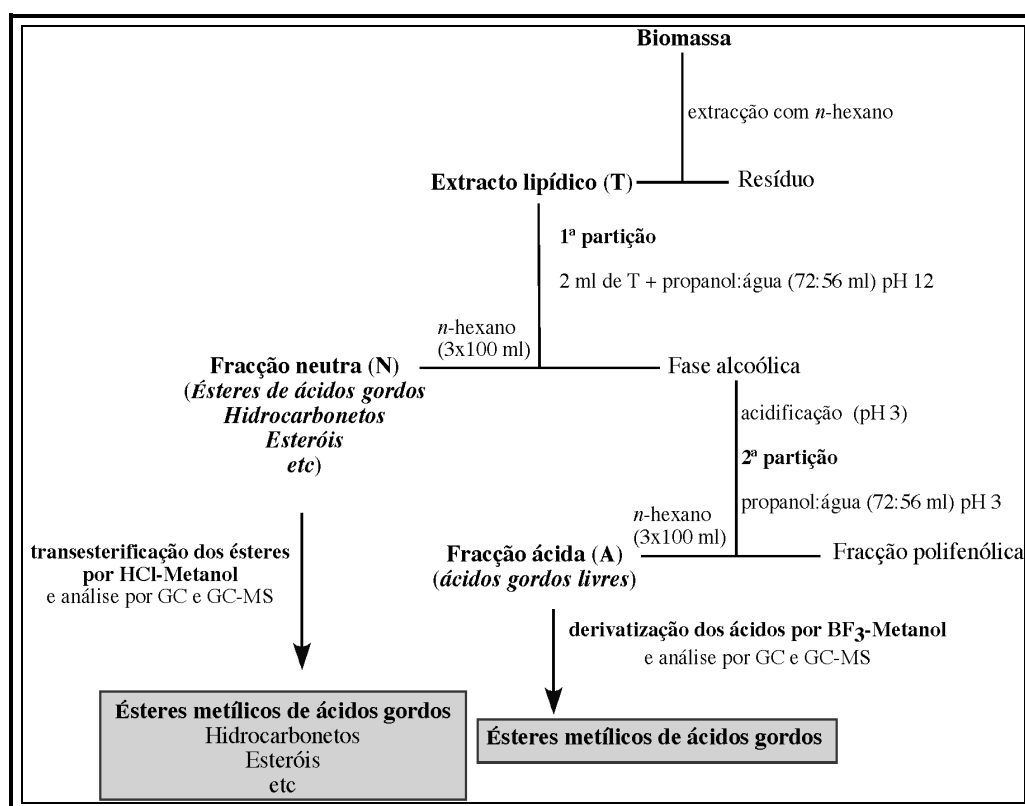


Figura V.3 – Esquema simplificado do procedimento utilizado para extracção de lípidos totais, obtenção das fracções neutra (N) e ácida (A) e derivatização de ácidos gordos livres e ácidos gordos esterificados. Adaptado de Fernandes-Ferreira 1990 (35).

## 4.2 – Análise dos ácidos gordos

### 4.2.1 – Derivatização da fracção neutra

Para analisar por cromatografia gasosa (GC) os ácidos gordos esterificados (AGE) presentes na fracção N (fig. V.3) procedeu-se à transesterificação das amostras segundo método descrito por Mason e Waller (36). Os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) assim obtidos, foram identificados por comparação com padrões autênticos e quantificados pelo método do padrão interno (p.i.). Por cada replicado foram realizadas pelo menos 3 análises. A identificação dos ácidos gordos foi confirmada por GC-MS. As características das colunas utilizadas e as condições operacionais de análise encontram-se descritas na Tabela V.3.

Tabela V.3 – Descrição das características das colunas utilizadas e das condições operacionais de análise em cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) obtidos por derivatização das fracções N e A.

GC	Aparelho Perkin Elmer 8600 com injector split-splitless a 300 °C, detector FID a 320 °C, coluna polar BP20 (SGE) 25 m x 0,22 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme (polietileno glicol)
GC-MS	Aparelho Perkin Elmer 8500 com injector split-splitless a 300 °C, coluna DB5 (J&W Scientific) 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme (5 % de fenil dimetilsiloxano) – detector de captura de iões (ITD Finnigan MAT) operando por impacto electrónico (EI) a 70 eV
Programa térmico, gases e pressão na coluna	100 °C – 240 °C (5 °C/min) seguido de patamar isotérmico (5 min.) H <sub>2</sub> e He <sub>2</sub> como gases de arraste em GC e GC-MS respectivamente, a uma pressão de 12,5 PSI

FID – Detector de ionização de chama

ID – Diâmetro interno

Para se proceder à transesterificação, as amostras (*ca.* 5 mg de fracção N por ml de *n*-hexano) foram secas sob fluxo de N<sub>2</sub> após o que se adicionou 0,355 mg de 5- $\alpha$ -colestano em *n*-hexano, corrigindo-se o volume da mistura para 1 ml. Seguidamente foram adicionados os reagentes, 0,25 ml de 2,2-dimetoxipropano (SUPELCO) e 1,25 ml

de uma solução de HCl (3 N) em metanol (mistura comercial, SUPELCO). A mistura de derivatização foi deixada a reagir durante 4 h a 50 °C e, durante a noite, à temperatura ambiente. Foi testada a utilidade de se neutralizar a mistura de derivatização após reacção, através da adição de uma mistura sólida de bicarbonato, carbonato e sulfato de sódio anidro (2:1:2 p/p) previamente seca a 110 °C, como tinha sido descrito por Fernandes-Ferreira (35). No entanto, para além de não se ter observado aumento significativo na recuperação dos ésteres metílicos, verificou-se que a adição desta mistura de sais, aumentava significativamente a variabilidade da resposta cromatográfica, ou seja, diminuía a reprodutibilidade (o coeficiente de variação (CV) aumentou de 16 para 26 %), pelo que se excluiu este passo do procedimento.

#### 4.2.1.1 – Quantificação dos ácidos gordos esterificados

A escolha do 5- $\alpha$ -colestano (hidrocarboneto) para padrão interno prendeu-se com o facto de se pretender um padrão que pudesse ser utilizado em todas as análises cromatográficas realizadas nesta experiência sobre ontogénese de compostos lipídicos. É um composto muito estável em *n*-hexano (o solvente utilizado), não existe nas amostras e apresenta características químicas de compromisso entre os diferentes grupos de compostos estudados – esteróis, alcanos e ácidos gordos. No caso dos ácidos gordos pesquisou-se inicialmente a presença de ácido heptadecanóico (17:0), que é o ácido geralmente utilizado como padrão na quantificação de ácidos gordos, mas verificou-se que se encontrava presente em algumas amostras. O mesmo se passou com outros ácidos gordos testados pelo que se assumiu que, se se conhecesse a discriminação e o factor de resposta de cada ácido gordo em relação ao 5- $\alpha$ -colestano, poder-se-ia usá-lo como padrão interno na análise quantitativa deste tipo de compostos. Os ácidos gordos podem encontrar-se esterificados a uma molécula de glicerol (ex: fosfolípidos, TAG, DAG) ou a uma molécula de um álcool alifático ou *n*-alcanol.

Para testar o efeito do comprimento da cadeia do *n*-alcanol ligado ao ácido gordo, na eficiência de derivatização e portanto na quantificação dos ácidos gordos transmetilados, foram preparadas duas séries de soluções de padrões éster diferentes: A e B. A primeira constituída por ésteres onde diferentes ácidos gordos estão ligados a um mesmo alcanol e, a segunda, por uma série de ácidos gordos ligados a um alcanol com número de átomos de carbono igual ao do respectivo ácido gordo. Na preparação das

séries foram utilizados padrões dissolvidos em *n*-hexano numa concentração conhecida de aproximadamente 1 mg/ml. A composição das séries encontra-se discriminada na Tabela V.4.

Tabela V.4 – Composição das duas séries de padrões éster (A e B) utilizadas para determinação do efeito do tamanho da cadeia carbonada do *n*-alcanol ligado ao ácido gordo na eficiência de derivatização e quantificação.

Série A		Série B	
Nome do composto	Nº C do alcanol /nº C do ácido	Nome do composto	Nº C do alcanol /nº C do ácido
Éster palmitil do ácido láurico	16/12	Éster lauril do ácido láurico	12/12
-	-	Éster miristil do ácido mirístico	14/14
Éster palmitil do ácido palmítico	16/16	Éster palmitil do ácido palmítico	16/16
Éster palmitil do ácido esteárico	16/18	Éster estearil do ácido esteárico	18/18
-	-	Éster araquidil do ácido araquídico	20/20
Éster palmitil do ácido beénico	16/22	-	-

As séries de padrões AGE foram submetidas a derivatização e analisadas em GC de modo idêntico ao descrito para as amostras. A função linear que traduz a relação entre o tempo de retenção cromatográfica (TR) dos FAME e o número de átomos de carbono (nº C) do ácido gordo respectivo foi usada para calcular os restantes TR da série homóloga de ácidos gordos metilados e, desse modo, identificar os ácidos gordos das amostras. Foram considerados os TR dos ácidos gordos compreendidos no intervalo de tempo correspondente ao incremento térmico linear da coluna.

Como seria de esperar, a relação observada entre o tempo de retenção cromatográfica (TR) dos FAME e o número de átomos de carbono do ácido gordo respectivo (nº C) para as séries A e B foi muito semelhante, pelo que se estimou a média dos valores comuns obtidos para determinar a função de correlação (fig. V.4).

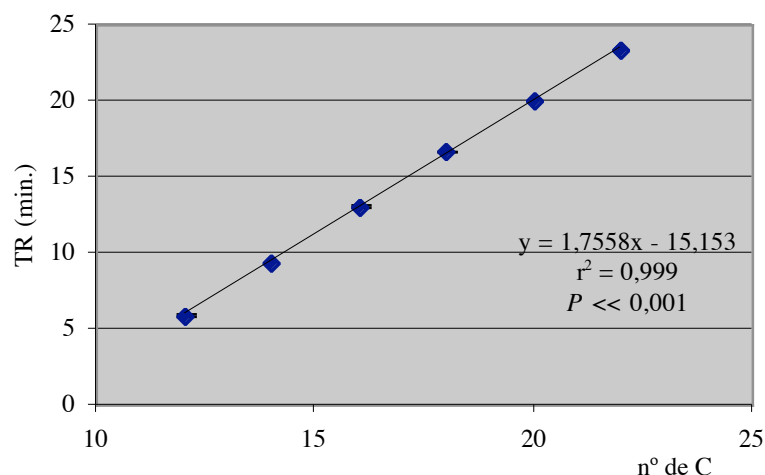


Figura V.4 – Relação linear entre os tempos de retenção apresentados pelos FAME e o número de átomos de carbono da cadeia dos ácidos gordos respectivos. A equação da função que descreve a relação, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e o  $P$  encontram-se inscritos na figura. As barras de erro ( $\pm$  SD) encontram-se representadas sobre os valores médios mas estão abaixo do nível de detecção visual.

Quando se utiliza o método do padrão interno para analisar quantitativamente uma série homóloga de compostos, principalmente quando o p.i. e os compostos a analisar são de natureza química diferente, torna-se necessário conhecer o factor de resposta (FR) dos compostos relativamente ao p.i. e a discriminação relativa (DR) de todos os compostos no injector. O FR, deve-se ao comportamento diferencial dos compostos relativamente ao p.i. (5- $\alpha$ -colestano) no que diz respeito ao nº de iões por unidade de massa do composto gerados por oxidação e detectados no detector FID, sendo FR = 1 quando o comportamento é igual. A discriminação relativa está relacionada com a volatilidade diferencial dos compostos a quantificar que determina diferentes razões de distribuição dos compostos entre o que, de cada um, é admitido na coluna e o que é expulso quando a amostra é injectada em condições de repartição de fluxo do gás de arrastamento. Determinou-se então um factor de correção (FC) que tivesse em consideração os efeitos FR e DR, de modo a corrigir directamente as áreas absolutas dos picos.

Para determinar este factor de correção, os padrões foram derivatizados na presença do p.i. e foram realizadas 6 a 7 análises em GC por série homóloga. A partir da massa de p.i. utilizada no frasco de derivatização ( $m_{p.i.}$ ), do valor obtido da área absoluta do pico



do p.i. ( $O_{p.i.}$ ) e da massa do ácido gordo  $i$  de cada éster utilizada na derivatização ( $m_i$ ) calcularam-se os valores de área absoluta dos picos dos ácidos gordos esperados ( $E_i$ ), através da equação referida no capítulo III, ou seja, assumindo que o FR = 1. A razão entre os valores observados ( $O_i$ ) e os esperados ( $E_i$ ) dá-nos um valor que traduzirá o diferencial de comportamento de cada composto relativamente ao p.i., e será tanto mais afastado de 1 quanto maiores forem os efeitos de DR e/ou FR. Ao representar-se graficamente todos os  $O_i/E_i$  em função do número de átomos de C do ácido gordo respectivo, obtidos para a série A e B, verificou-se que, o modelo linear descreveu bem a relação entre aquelas variáveis (fig. V.5). As diferenças encontradas entre os  $O_i/E_i$  da série A e da série B não foram devidas a diferenças relacionadas com o tipo de  $n$ -alcanol a que se encontravam esterificados os ácidos gordos pois, para além dos valores obtidos se encontrarem dentro do erro experimental (ver barras de  $\pm SE$ ), o éster palmitil do ácido palmítico é comum (controlo) a ambas as séries e apresentou um desvio semelhante aos restantes ésteres (Tabela V.4 e fig. V.5). Por esta razão estimou-se um valor médio para se determinar a equação da recta que se utilizou posteriormente como factor de correção na quantificação dos FAME das amostras. Para o cálculo da recta não se entrou em consideração com o ponto relativo ao éster metílico do ácido mirístico (C = 14) devido a um erro experimental associado (fig. V.5).

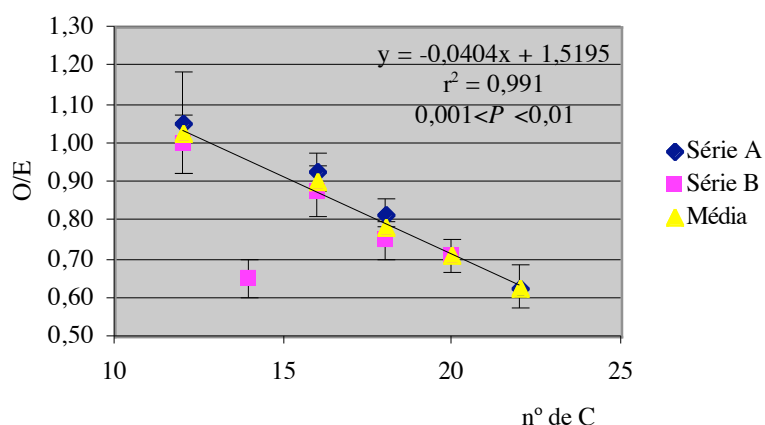


Figura V.5 – Relação linear entre as áreas dos picos dos FAME observados e esperados (O/E) e o respectivo número de átomos de carbonos da cadeia dos ácidos gordos. As barras de erro correspondem a  $\pm SE$ . A equação da função que descreve a relação média, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e o  $P$  encontram-se inscritos na figura.

#### 4.2.2 – Derivatização da fracção ácida

Os ácidos gordos livres (AGL) presentes na fracção A (fig. V.3) foram derivatizados por metilação, com algumas modificações aos métodos originais (37, 38). Os FAME obtidos foram identificados e quantificados tal como acima descrito para os ésteres.

Volumes correspondentes a *ca.* 0,5 mg das várias fracções A foram secos sob fluxo de N<sub>2</sub>. Seguidamente foram adicionados 100 µl do reagente, BF<sub>3</sub> em 20 % de metanol (mistura comercial, MERCK) e 200 µl de *n*-hexano. A mistura de derivatização reagiu durante 2 min. a 90 °C. Posteriormente foi adicionado o p.i. (0,355 mg de 5- $\alpha$ -colestano) dissolvido em *n*-hexano.

##### 4.2.2.1 Quantificação dos ácidos gordos livres

Como foi referido na introdução, a grande maioria dos ácidos gordos presentes nos tecidos vegetais são insaturados. De modo a estudar o efeito da presença de ligações duplas na cadeia carbonada dos ácidos gordos quer no TR quer no FC, prepararam-se duas soluções padrão, cada uma constituída por uma série homóloga de ácidos gordos: uma constituída por ácidos gordos saturados (C) e a outra por ácidos gordos monoinsaturados (D). Tal como para as séries de ésteres, os AGL destas séries foram dissolvidos em *n*-hexano numa concentração conhecida de aproximadamente 1 mg/ml. A composição destas séries encontra-se discriminada na Tabela V.5.

Tabela V.5 – Composição das duas séries de padrões de ácidos gordos, uma composta por ácidos saturados (C) e outra por monoinsaturados (D).

Série C		Série D	
Nome do composto (nome vulgar)	n° C :lig. duplas	Nome do composto	n° C :lig. duplas
Ácido dodecanóico (Láurico)	12:0		
Ácido tetradecanóico (Mirístico)	14:0	Ácido miristoleico, <i>cis</i> -9	14:1
Ácido pentadecanóico	15:0		
Ácido hexadecanóico (Palmítico)	16:0	Ácido palmitoleico, <i>cis</i> -9	16:1
Ácido heptadecanóico (Margárico)	17:0		
Ácido octadecanóico (Esteárico)	18:0		
Ácido eicosanóico (Araquídico)	20:0	Ácido eicosenóico, <i>cis</i> -11	20:1
Ácido docosanóico (Beénico)	22:0	Ácido erúico, <i>cis</i> -13	22:1
Ácido tetracosanóico (Linhocérico)	24:0	Ácido nervónico, <i>cis</i> -15	24:1

As séries de padrões de AGL foram submetidas a derivatização e analisadas em GC de modo idêntico ao descrito para as amostras.

Como seria de esperar, a relação observada entre o tempo de retenção cromatográfica (TR) dos FAME da série C e o número de átomos de carbono do ácido gordo respectivo (n° C) foi muito semelhante à obtida para os FAME obtidos por transesterificação, visto se terem usado ésteres de ácidos gordos saturados (figs. V.4 e V.6). A diferença encontrada entre os FAME saturados e monoinsaturados foi apenas na ordenada na origem, mostrando que os últimos apresentaram um desvio de aproximadamente mais 1 min. relativamente aos saturados correspondentes (fig. V.6).

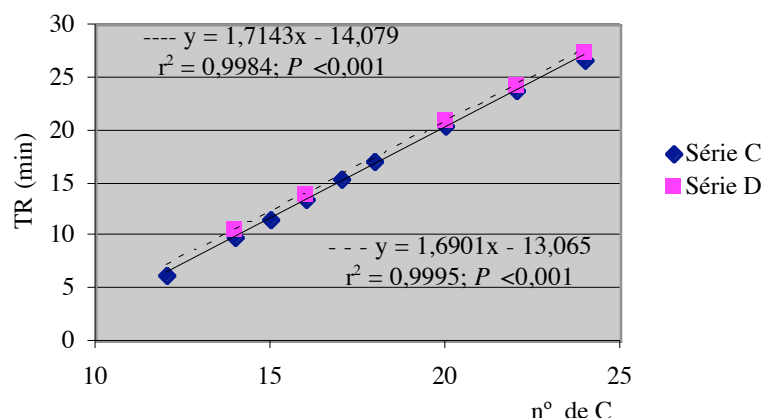


Figura V.6 – Relação linear entre os tempos de retenção apresentados pelos FAME de ambas as séries de ácidos gordos livres (C e D) e o número de átomos de carbono da respectiva cadeia hidrocarbonada. As equações que descrevem as relações, os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e os  $P$  encontram-se inscritos na figura.

Para determinar o FC, os padrões de AGL foram processados tal como as amostras e foram realizadas 7 a 11 análises em GC por série. Contrariamente ao observado com os ésteres, a análise cromatográfica feita com ácidos gordos livres (AGL), saturados ou insaturados, foi mais reprodutível, apresentando CVs de 3 a 10%. A figura V.7 representa a relação entre os  $O_i/E_i$  em função do número de átomos de C do ácido gordo respectivo, obtida para a série C (AGL saturados) e D (AGL insaturados).

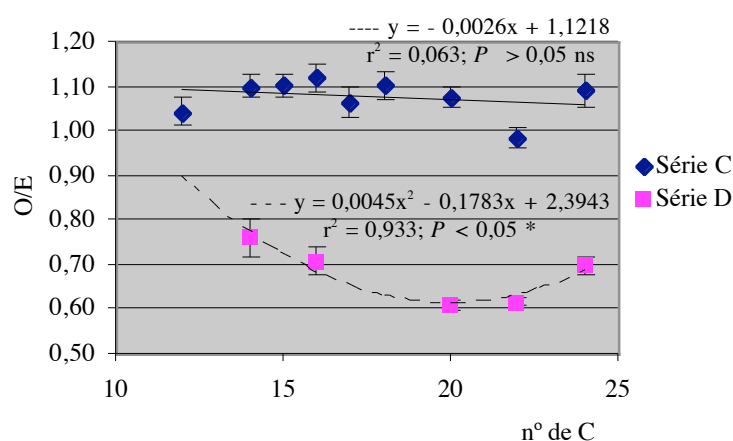


Figura V.7 – Relação linear e polinomial de 2º grau entre a razão  $O/E$  e o número de átomos de carbono dos ácidos gordos, para a série C (AGL saturados) e D (AGL insaturados) respectivamente. As equações das funções, com os respectivos coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e os  $P$  encontram-se inscritos na figura. As barras de erro correspondem a  $\pm SE$ .

Ao contrário do observado para os ésteres de ácidos gordos (saturados), em que uma função linear descrevia a relação entre os O/E e o n° de C dos FAME, aqui, a relação linear obtida para a série C (ácidos gordos saturados livres) não foi estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) (figs. V.5 e V.7), ou seja, O/E não depende significativamente do n° de C dos FAME. No caso dos AGL parece que os métodos utilizados para proceder à sua quantificação, não afectaram diferentemente a estimativa de cada ácido gordo. Deste modo, utilizou-se como FC, não uma função linear como no caso dos ésteres, mas uma constante, o inverso da abcissa na origem, ou seja,  $FC = 1/1,1$ .

A relação entre a razão O/E e o n° de C dos FAME obtidos a partir dos ácidos monoinsaturados (série D) foi muito diferente da observada com os obtidos a partir dos ácidos saturados (série C) (fig. V.6), sendo o modelo polinomial de 2º grau o que melhor descreveu aquela relação. Observou-se ainda que, quer as diferenças entre o TR dos AGL insaturados e AGL saturados respectivos ( $TR_{\text{insat},i} - TR_{\text{sat},i}$ ), quer os desvios padrão (SD) estimados para as várias injeções dos FAME insaturados, variaram com o número de átomos de C também segundo uma função quadrática, tendo apresentado igualmente um mínimo em  $C = 20$  (dados não apresentados). Estas evidências experimentais parecem apontar a interacção com a fase estacionária e a detecção como os factores mais prováveis para explicar este facto.

Todos os padrões utilizados nas análises quantitativas foram compostos com um grau de pureza superior a 99 % (SIGMA, barcelona).

## 5 – Análise estatística

### 5.1 – Análise de variâncias e análise de regressão

As diferenças dos teores de lípidos totais, fracções neutra e ácida, e nos teores individuais dos ácidos gordos, obtidas para as diferentes amostras, foram analisadas estatisticamente recorrendo ao teste de análise de variâncias (ANOVA). O pressuposto da homocedasticidade foi cumprido para todas as variáveis, recorrendo quando necessário (teste Bartlett  $P < 0,05$ ), à transformação pela função “raíz quadrada” da variável. As comparações *post hoc* entre as várias amostras e para as diferentes variáveis estudadas (lípidos, fracções N e A, AGL e AGE) foram realizadas através do teste HSD Tukey. Análises de correlação e regressão foram efectuadas de modo a

estudar as relações entre algumas das variáveis estudadas. Estas análises foram realizadas no programa Statistica@4.1 da StatSoft, Inc.

### *5.2 – Análise de componentes principais*

A análise de componentes principais (PCA) constituiu uma abordagem estatística aplicada ao estudo da variação dos AGL e AGE em culturas de linho, com o objectivo de evidenciar uma possível estrutura intrínseca nos dados. A hipótese subjacente foi a da existência de uma ontogénese química associada ao processo morfogénico em estudo – a embriogénese somática. Para a escolha do número de factores a considerar, foi usado um critério arbitrário de compromisso entre explicar um mínimo de 75 % da inércia total (ou variabilidade) e usar um máximo de 3 factores, de modo a captar a “essência” do sistema biológico sem recorrer a muitas variáveis explanatórias. As análises foram realizadas no programa “ADE-4: a multivariate analysis and graphical display”. disponibilizado via internet pelos seus autores (ver Apêndice B). A racionalização matemática desta ferramenta de análise é bastante complexa e extravaza não só o âmbito deste trabalho como a importância relativa que nele teve. No entanto, e de modo a justificar a sua pertinência no estudo da variação dos ácidos gordos durante a embriogénese somática e o crescimento dos *calli*, ou seja, na ordenação e estruturação de um grande conjunto de dados, são focados, em apêndice, alguns dos aspectos principais deste tipo de análise (Apêndice B).

## Resultados

### *I – Variação ontogénica dos lípidos totais e das respectivas fracções neutra e ácida*

Na Tabela V.6 estão representados os valores de lípidos totais e das respectivas fracções neutra e ácida das diferentes amostras como percentagem da biomassa seca. Os valores mais elevados de ambas as fracções foram observados nos explantes primários, diminuindo progressivamente com a desdiferenciação dos tecidos e indução e desenvolvimento de *callus*. Os embriões somáticos apresentaram valores intermédios entre os *calli* e os explantes primários, tendo a fracção neutra diminuído significativamente de  $t_2$  para  $t_3$ . Não se verificaram diferenças significativas entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos, quer em  $t_2$  quer em  $t_3$ , relativamente aos teores da fracção ácida e da fracção neutra.

A variação da fracção ácida seguiu aproximadamente a da fracção neutra, embora esta apresentasse valores 2,5 vezes superiores em média (fig. V.8). Analisando especificamente a razão fracção neutra/fracção ácida (fig. V.9), que tem o efeito de ampliar as diferenças, verificou-se que os embriões somáticos apresentaram valores inferiores aos restantes tecidos diferenciados. Os *calli* embriogénicos em  $t_2$  apresentaram os valores mais baixos, sendo que a diferença relativamente aos *calli* não-embriogénicos foi muito significativa devido essencialmente a uma menor proporção da fracção neutra naqueles *calli* (Tabela V.6).

Tabela V.6 – Teores de lípidos totais e das respectivas fracções neutra e ácida como percentagem da biomassa seca, em segmentos de hipocótilo (SH), segmentos de hipocótilo com desdiferenciação de tecidos e desenvolvimento de *calli* nas superfícies de corte (SHC), *calli* não-embriogénicos (CNE), *calli* embriogénicos (CE) e embriões somáticos (ES) obtidos durante o ensaio. Para cada variável experimental e em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

Material vegetal	Lípidos totais (%)				Fracção neutra (%)				Fracção ácida (%)			
	Tempo de amostragem (semanas)											
	t <sub>0</sub> (0)	t <sub>1</sub> (2)	t <sub>2</sub> (5)	t <sub>3</sub> (7)	t <sub>0</sub> (0)	t <sub>1</sub> (2)	t <sub>2</sub> (5)	t <sub>3</sub> (7)	t <sub>0</sub> (0)	t <sub>1</sub> (2)	t <sub>2</sub> (5)	t <sub>3</sub> (7)
SH	15,6a				15,4 a				6,04 a			
SHC		7,03c				4,98 bd				1,73 bd		
CNE			3,41 bd	2,03 b			2,70 be	1,03 e			0,90 bc	0,44 c
CE			3,45 bd	2,31 b			1,67 ce	1,25 ce			1,19 bc	0,53 c
ES			6,17 c	5,37 cd			6,36 d	2,83 bc			2,81 d	1,54 bd

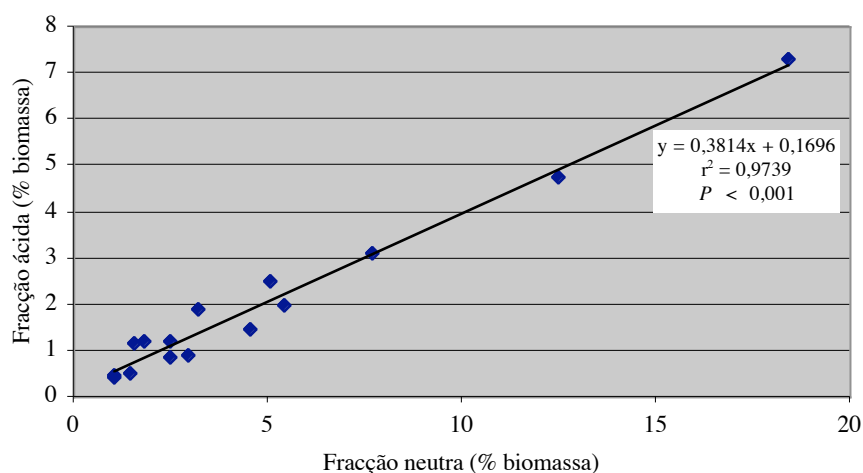


Figura V.8 – Relação entre os teores das fracções neutras e os das fracções ácidas nas diferentes amostras. A equação e respectivos valores de  $r^2$  e  $P$  encontram-se representados em caixa inclusa.



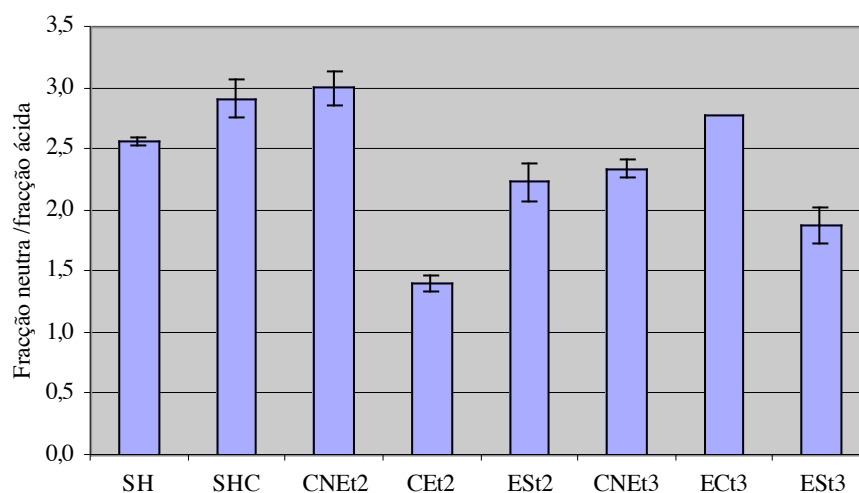


Figura V.9 – Razão fracção neutra/fracção ácida nas diferentes amostras. Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD).

Paralelamente à variação das fracções lipídicas, verificou-se que os *calli* embriogénicos apresentaram um crescimento significativamente inferior ao dos *calli* não-embriogénicos na última fase de cultura (fig. V.10). Dada a inexistência de diferenças significativas entre estes dois tipos de *calli* relativamente aos teores das fracções estudadas (Tabela V.6), pode-se admitir que, pelo facto dos *calli* não-embriogénicos não estarem sujeitos a pressão morfogénica, ocorrerá nestes uma maior alocação do carbono para o crescimento, ao passo que nos *calli* embriogénicos, haverá uma partição entre o crescimento do tecido e os processos inerentes à embriogénese somática.

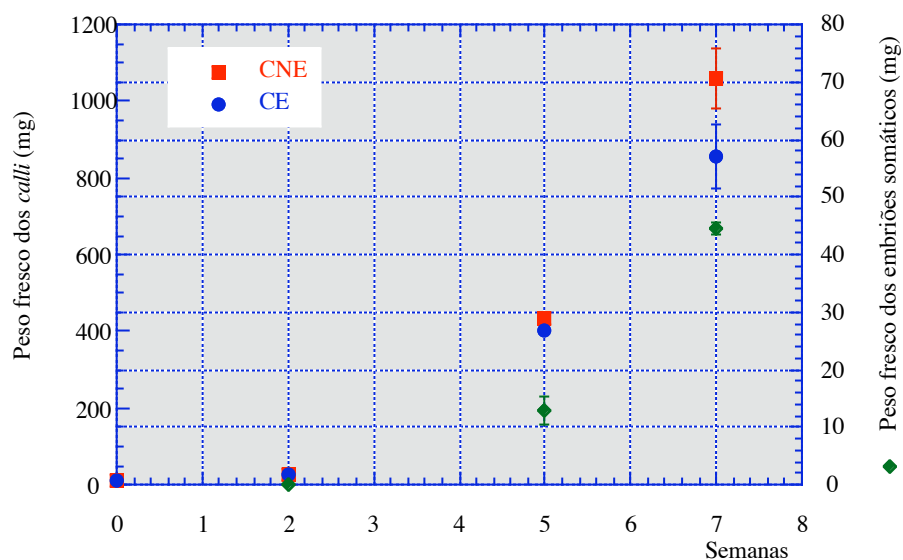


Figura V.10 – Variação do peso fresco médio dos *calli* não-embriogênicos (CNE), *calli* embriogênicos (CE) e embriões somáticos (ES) ao longo do período experimental. Encontram-se representadas para cada valor médio a barra correspondente ao desvio padrão (SD).

## 2 – Ácidos gordos livres (AGL)

### 2.1 – Identificação

Foram identificados e quantificados 14 ácidos gordos livres (AGL). Para o material vegetal amostrado (que daqui em diante, se designará genericamente por “tecidos”, por motivos de ordem prática) os AGL identificados, os respectivos teores médios e erros padrão (SE) associados, encontram-se representados na Tabela V.7. Na Tabela V.8 estão representados somatórios de grupos de ácidos gordos (somatório total e somatórios parciais) e algumas relações específicas consideradas relevantes para discussão.

Tabela V.7 – Teores de ácidos gordos livres (AGL) quantificados nas frações ácidas obtidas a partir dos diferentes tecidos (SH, SHC, CNE, CE e ES) colhidos nas 4 amostragens feitas ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ). Encontram-se representados para cada composto, o seu tempo de retenção na coluna (TR) nas condições de operação em GC, o valor médio estimado (mg/g lípidos totais) e o respectivo erro padrão (SE) entre parêntesis.

Compostos (AGL)	TR (min.)	Amostras (tempo de amostragem)							
		SH ( $t_0$ )	SHC ( $t_1$ )	CNE ( $t_2$ )	CE ( $t_2$ )	ES ( $t_2$ )	CNE ( $t_3$ )	CE ( $t_3$ )	ES ( $t_3$ )
14:0	9,81	1,56 (0,308)	1,08 (0,154)	1,17 (0,085)	0,54 (0,07)	1,20 (0,093)	1,31 (0,234)	0,63 (0,013)	1,44 (0,604)
15:0	11,68	0,92 (0,194)	0,55 (0,110)	0,85 (0,154)	0,52 (0,009)	0,57 (0,067)	0,99 (0,235)	0,71 (0,005)	0,48 (0,001)
16:0	13,55	10,8 (1,47)	15,6 (2,58)	34,7 (11,88)	31,9 (3,69)	23,7 (2,53)	32,9 (5,24)	31,0 (4,15)	46,0 (13,03)
16:1	13,87	1,14 (0,638)	0,97 (0,569)	0,77 (0,169)	1,03 (0,074)	0,97 (0,051)	0,91 (0,047)	1,18 (0,092)	2,75 (1,267)
17:0	15,37	0,86 (0,187)	0,56 (0,046)	0,72 (0,141)	0,49 (0,077)	1,66 (0,024)	0,94 (0,104)	0,72 (0,062)	0,77 (0,219)
18:0	17,15	5,60 (0,675)	3,86 (0,198)	6,18 (1,412)	4,19 (0,530)	6,47 (1,426)	5,72 (1,444)	3,80 (0,463)	5,43 (0,136)
18:1	17,42	1,64 (0,418)	3,03 (0,515)	6,73 (2,437)	6,03 (0,293)	3,08 (0,407)	3,20 (0,608)	2,97 (0,288)	2,27 (0,159)
18:2	18,21	4,68 (0,765)	18,1 (3,45)	51,5 (20,66)	61,5 (7,11)	32,5 (3,94)	45,2 (4,78)	52,2 (8,72)	52,1 (3,04)
18:3	19,31	3,83 (0,368)	13,5 (1,04)	26,8 (10,19)	35,6 (3,37)	29,5 (3,04)	30,4 (2,92)	36,3 (5,39)	63,2 (0,76)
20:0	20,81	0,37 (-)	0,31 (-)	0 (-)	0,56 (0,030)	0,58 (0,035)	0,30 (0,028)	0,34 (0,004)	0,17 (-)
20:1	21,45	0,98 (-)	0,92 (0,282)	1,01 (0,062)	0,36 (0,054)	1,12 (0,058)	0,76 (0,234)	0,48 (0,058)	0,35 (0,047)
22:0	23,98	0,80 (-)	0,95 (-)	2,05 (-)	0,9 (0,161)	0,93 (0,170)	1,59 (0,060)	1,63 (0,195)	1,31 (0,075)
23:0	26,74	1,19 (-)	1,66 (0,565)	1,97 (0,143)	1,83 (0,017)	1,43 (0,124)	2,29 (0,126)	1,82 (0,005)	1,3 (0,088)
24:0	27,04	1,76 (0,386)	2,49 (1,416)	1,31 (0,222)	0,74 (0,027)	1,42 (0,066)	0,82 (0,143)	0,56 (0,040)	0,55 (0,224)

(-) devido à impossibilidade técnica de se quantificar um dos duplicados não se estimou medida de erro.

Tabela V.8 – Somatórios (total e parciais) e relações entre AGL quantificados nas frações ácidas obtidas a partir dos diferentes tecidos (SH, SHC, CNE, CE e ES) colhidos nas 4 amostragens feitas ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ). Encontram-se representados para cada variável, o valor médio estimado a partir dos duplicados e o respectivo desvio padrão (SD) entre parêntesis. No caso dos somatórios, os valores estão expressos em mg/g de lípidos totais; no caso das proporções os valores são adimensionais tendo nalguns casos, como base, o somatório dos AGL totais (T).

Variáveis	Amostras (tempo de amostragem)							
	SH ( $t_0$ )	SHC ( $t_1$ )	CNE ( $t_2$ )	CE ( $t_2$ )	ES ( $t_2$ )	CNE ( $t_3$ )	CE ( $t_3$ )	ES ( $t_3$ )
AGL totais (T)	35 (2,1)	63 (14,6)	135 (67,7)	146 (21,6)	105 (16,4)	127 (22,8)	134 (26,4)	178 (16,3)
AGL insaturados (I)	12 (0,8)	36 (8,3)	87 (47,4)	104 (15,2)	67 (10,4)	80 (12,1)	93 (20,1)	121 (3,7)
AGL saturados (S)	23 (2,9)	26 (6,3)	48 (20,3)	42 (6,4)	38 (6,0)	47 (10,7)	41 (6,2)	57 (20,0)
PUFAs	8,5 (1,60)	32 (6,4)	78 (43,6)	97 (14,8)	62 (9,9)	76 (10,9)	88 (20,0)	115 (5,4)
VLCFAs	3,4 (1,81)	5,7 (2,31)	5,3 (1,02)	4,4 (0,28)	5,5 (0,19)	5,8 (0,76)	4,8 (0,43)	3,6 (0,28)
16:0+18:1	13 (2,7)	19 (4,4)	41 (20,2)	38 (5,6)	27 (4,2)	36 (8,3)	34 (6,2)	48 (18,2)
PUFAs/T	0,25 (0,061)	0,50 (0,015)	0,57 (0,037)	0,66 (0,003)	0,59 (0,002)	0,60 (0,021)	0,66 (0,020)	0,65 (0,090)
I/S	0,52 (0,102)	1,4 (0,01)	1,8 (0,24)	2,5 (0,02)	1,8 (0,003)	1,7 (0,14)	2,2 (0,15)	2,3 (0,85)
I/T	0,34 (0,044)	0,58 (0,002)	0,64 (0,032)	0,71 (0,002)	0,64 (0,0003)	0,63 (0,018)	0,69 (0,014)	0,68 (0,083)
VLCFAs/T	0,10 (0,059)	0,089 (0,0161)	0,043 (0,0140)	0,030 (0,0025)	0,053 (0,0064)	0,045 (0,0022)	0,037 (0,010)	0,020 (0,0003)
16:0/T	0,31 (0,041)	0,25 (0,001)	0,26 (0,005)	0,22 (0,004)	0,23 (0,001)	0,26 (0,012)	0,23 (0,002)	0,26 (0,080)
18:0/T	0,16 (0,018)	0,062 (0,010)	0,048 (0,0094)	0,029 (0,0009)	0,061 (0,0097)	0,044 (0,0081)	0,028 (0,0007)	0,031 (0,0017)
18:1/T	0,047 (0,014)	0,048 (0,0004)	0,050 (0,0006)	0,041 (0,0034)	0,029 (0,0009)	0,025 (0,0023)	0,022 (0,0013)	0,013 (0,0024)
18:2/T	0,14 (0,040)	0,29 (0,012)	0,38 (0,029)	0,42 (0,007)	0,31 (0,005)	0,36 (0,011)	0,39 (0,016)	0,30 (0,051)
18:3/T	0,11 (0,022)	0,22 (0,027)	0,20 (0,008)	0,24 (0,003)	0,28 (0,003)	0,24 (0,011)	0,27 (0,004)	0,36 (0,039)
18:0/18:3	1,5 (0,45)	0,29 (0,011)	0,25 (0,058)	0,12 (0,005)	0,22 (0,037)	0,19 (0,042)	0,10 (0,004)	0,086 (0,0045)
18:3/18:2	0,83 (0,080)	0,76 (0,125)	0,53 (0,019)	0,58 (0,017)	0,91 (0,023)	0,67 (0,010)	0,70 (0,019)	1,2 (0,08)

AGL – ácidos gordos livres; PUFAs – ácidos gordos polinsaturados; VLCFA – ácidos gordos de cadeia muito longa.

## 2.2 – Variação ontogénica dos teores específicos de cada composto das fracções de AGL

O teor de ácidos gordos livres (AGL) totais aumentou com a desdiferenciação dos tecidos do hipocótilo e a concomitante indução e desenvolvimento de *callus*, não havendo, contudo, diferenças significativas entre os diferentes tipos de *calli* quer em função da capacidade embriogénica quer do tempo em cultura (Tabela V.8). Os embriões somáticos apresentaram teores de ácidos gordos totais semelhantes aos obtidos em *calli*, não variando significativamente de  $t_2$  para  $t_3$  (Tabela V.8). Os AGL insaturados seguiram de perto e quase paralelamente a variação dos AGL totais (Tabela V.8), explicando portanto a maior parte da variabilidade total (fig. V.11a). No entanto, o teor destes compostos foi significativamente maior nos embriões somáticos em  $t_3$  que nos amostrados na fase anterior ( $t_2$ ) (Tabela V.8). Os AGL insaturados constituem a maior parte dos AGL totais (fig. V.11a) sendo que, nos *calli* e nos embriões, só os AGL polinsaturados (PUFAs) derivados do ácido esteárico (18:2 e 18:3) representaram 90 a 96 % dos AGL insaturados (fig. V.11b). Proporções inferiores foram observadas nos explantes e nas fases iniciais da desdiferenciação dos tecidos e crescimento de *callus* (SHC), *ca.* de 72 e 87 % respectivamente (fig. V.11b), onde os AGL insaturados foram menos abundantes e tiveram também menor peso que os AGL saturados (Tabela V.8 e fig. V.11a). Estes compostos constituíram uma fracção menor dos AGL totais e não sofreram oscilações tão apreciáveis nos tecidos vegetais amostrados, quer ao longo do tempo, quer no decorrer do processo embriogénico (Tabela V.8 e fig. V.11a). Apenas os  $ES_t3$  apresentaram valores significativamente superiores aos observados nos explantes e nos SHC (Tabela V.8). Apesar desta diferença na variação ontogénica de AGL saturados e insaturados, a proporção de AGL insaturados dos tecidos, estimada quer a partir da razão AGL insaturados/saturados (I/S), quer da razão AGL insaturados/totais (I/T) não foi globalmente muito distinta (Tabela V.8). O nível de insaturação livre aumentou muito significativamente com a desdiferenciação, mantendo-se posteriormente num valor aproximadamente constante entre 1,7 e 2,5 e entre 0,63 e 0,71, para a primeira e segunda variáveis referidas respectivamente (Tabela V.8).

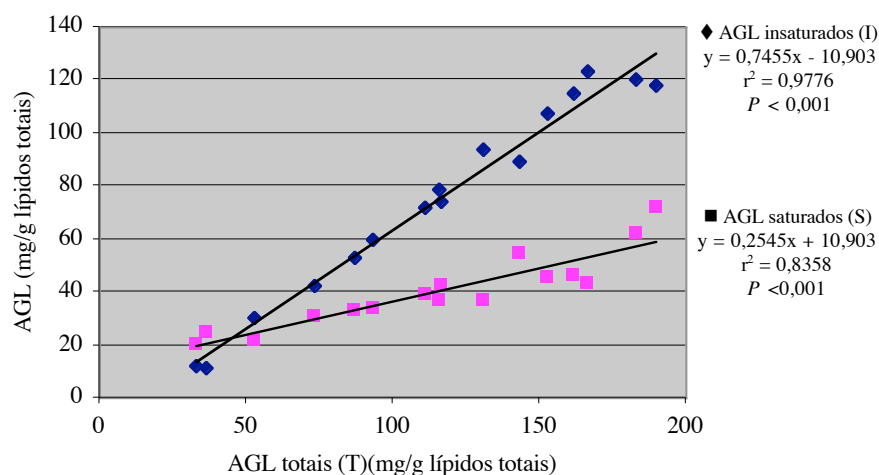


Figura V.11a) – Relação entre os AGL insaturados (I) e os AGL saturados (S) com os AGL totais (T). A equação das rectas e os respectivos valores de  $r^2$  e  $P$  encontram-se na legenda.

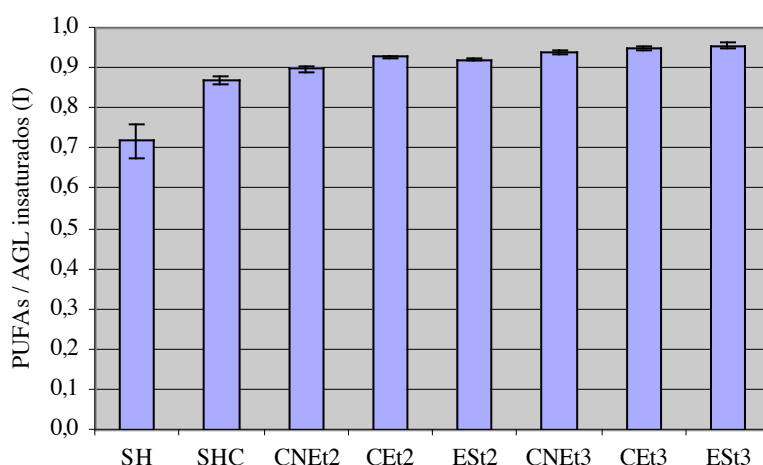


Figura V.11b) – Razão entre PUFAs e AGL insaturados nas diferentes amostras. Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

Os VLCFA, que como já foi referido, são frequentemente associados à cutícula epidérmica, não apresentaram variações significativas, tendo-se observado um valor residual de 3,4 a 5,7 mg/g de lípidos totais. Com base neste resultado pode questionar-se se os mecanismos para a produção destes ácidos gordos (elongação a partir de ácidos gordos sintetizados *de novo* ou através da hidrólise que lípidos de reserva) estarão

inactivos neste sistema experimental ou se simplesmente não ocorre acumulação nos tecidos que os produzem. Como os AGL saturados de cadeia mais curta ( $\leq$  C18) são essencialmente sintetizados *de novo*, este conjunto de resultados sugere que a variação observada nos AGL poderá ser suportada por ácidos gordos esterificados.

O “pool” celular de AGL era essencialmente composto pelos ácidos 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 (Tabela V.7). Este resultado foi igualmente verificado em culturas de *calli* de outras espécies (39). Notaram-se, contudo, diferenças na importância relativa dos diferentes ácidos gordos associadas aos diferentes tipos de tecido e ao processo embriogénico. Para maior facilidade de interpretação dos resultados obtidos, constituíram-se 3 grupos de AGL com base no comportamento mais ou menos comum que evidenciaram ao longo do período experimental:

- O grupo de *cadeia média* – constituído pelos AGL 14:0 e 15:0 – caracterizou-se por uma amplitude de variação pouco relevante e por valores absolutos relativamente baixos, apresentando máximos em SH. Os *calli* embriogénicos apresentam tendencialmente valores mais baixos que os não-embriogénicos (Tabela V.7);
- O grupo de *cadeia muito longa* – constituído pelos VLCFA (com excepção do 22:0 e 23:0) – apresentou uma amplitude de variação também pouco relevante, tendo-se caracterizado fundamentalmente pela diminuição significativa nos embriões somáticos associada ao seu desenvolvimento (Tabela V.7); e
- O grupo de *cadeia longa ou C18* – constituído pelos derivados insaturados do ácido esteárico (C18:0) – apresentou globalmente valores mais elevados e variações de grande amplitude. Caracterizou-se por apresentar os teores mais baixos nos explantes primários, aumentando significativamente com a produção de *calli*. Especificamente, os teores máximos de 18:1 foram registados em *calli* em crescimento activo ( $t_2$ ); os de 18:2 em *calli*, independentemente da respectiva fase de crescimento, e em embriões mais desenvolvidos ( $t_3$ ); e os de 18:3 em ESt<sub>3</sub>.

Os restantes AGL apresentaram padrões de variação menos evidentes e, portanto, menos tipificáveis. Os VLCFA, 22:0 e 23:0, e o ácido gordo de cadeia longa 18:0, não apresentaram qualquer variação estatisticamente mensurável. O teor do AGL mais representado em  $t_0$ , 16:0, não sofreu alterações apreciáveis durante o processo de desenvolvimento tendo, apenas, em ESt<sub>3</sub>, um valor mais elevado que o observado nos tecidos das duas primeiras amostragens (Tabela V.7). Raramente identificado em

tecidos vegetais, 17:0 apresentou efectivamente valores sempre baixos (< 2 mg/g lípidos totais), sendo que o respectivo teor máximo registado em ESt<sub>2</sub>, foi significativamente diferente dos registados nos restantes tecidos (Tabela V.7). O ácido gordo 20:1, apesar de se incluir no perfil dos ácidos de cadeia muito longa, apresentou em t<sub>2</sub> valores significativamente mais baixos em CE do que em CNE, à semelhança do grupo de cadeia média (Tabela V.7).

No que diz respeito às variações ocorridas nos AGL maioritários, como proporção dos AGL totais, observaram-se tendências diferentes das anteriormente descritas. Os resultados encontram-se representados na Tabela V.8 e na figura V.12.

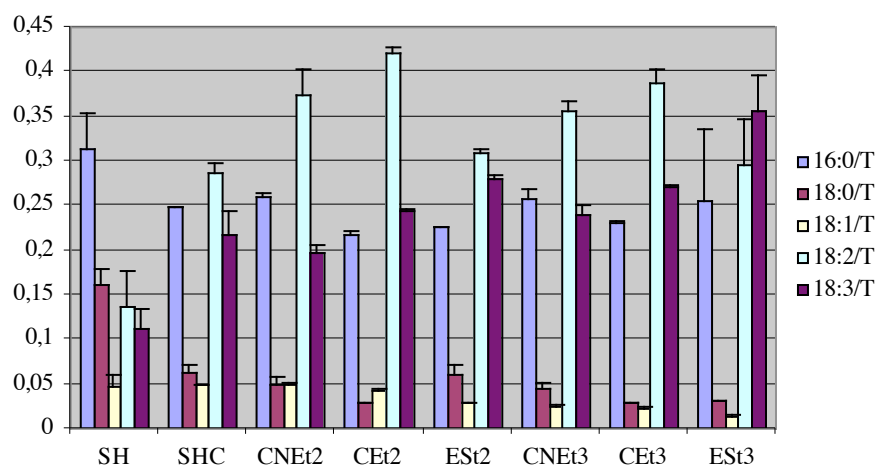


Figura V.12 – Proporção dos AGL maioritários (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3) relativamente aos AGL totais nas diferentes amostras. No topo de cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão respectiva.

O 16:0 representou um valor aproximadamente constante de 24 % dos ácidos totais em todos os tecidos, à excepção de SH onde se observou um valor máximo de 31 %. O 18:0, que em termos absolutos não sofreu oscilações assinaláveis, diminuiu proporcionalmente de modo muito significativo com a desdiferenciação e com o desenvolvimento dos embriões somáticos (Tabela V.8 e fig. V.12). Como é o precursor directo de um dos produtos principais da síntese *de novo* – o ácido gordo 18:1 – parece razoável pensar que a desaturase do ácido esteárico terá uma actividade constante nos tecidos amostrados e que a variação observada traduz apenas a variação ocorrida nos



ácidos totais. Contrariamente, o 18:1 apresentou valores mais elevados nas primeiras fases e em *calli*  $t_2$ , diminuindo significativamente em  $t_3$ . Este resultado parece apoiar a ideia de que, sendo este ácido gordo o precursor da maioria dos lípidos de membranas celulares, se deva encontrar bastante disponível nos tecidos em crescimento activo de modo a responder às elevadas taxas de síntese daquelas estruturas. Uma diminuição na proporção de 18:1 foi igualmente observada com o desenvolvimento dos embriões somáticos (Tabela V.8). As insaturações subsequentes do 18:1 são feitas com o ácido ligado, portanto, a ocorrerem livres nos tecidos, os ácidos gordos polinsaturados 18:2 e 18:3 terão de ser o resultado de hidrólise e não de síntese. Como seria de esperar, estes ácidos gordos, por serem os que constituem a maior parte dos AGL totais, têm um comportamento semelhante quer em termos absolutos quer em termos relativos (Tabela V.7 e V.8). Embora ambos sejam os principais ácidos gordos que compõem os fosfolípidos e outros lípidos de membrana, 18:2 tem sido descrito como sendo mais importante nas membranas plasmáticas e nas membranas mitocondriais, enquanto que 18:3 abunda nos tilacóides, fazendo parte dos glicolípidos (40). Atendendo aos processos inerentes ao crescimento celular por um lado, e ao desenvolvimento de embriões somáticos por outro, faz sentido estudar-se a variação relativa destes ácidos gordos. Assim, tentando resumir os aspectos mais relevantes e clarificar o significado biológico deste diferente padrão de distribuição e variação dos AGL do grupo *C18*, estudou-se a variação das razões 18:3/18:2 e 18:0/18:3. A razão 18:3/18:2 não variou durante as primeiras fases da desdiferenciação dos explantes mas diminuiu muito significativamente ( $P < 0,001$ ) em *calli*  $t_2$ , sendo este tipo de tecido, independentemente da sua capacidade embriogénica, o que apresentou valores mais baixos (Tabela V.8 e fig. V.13).

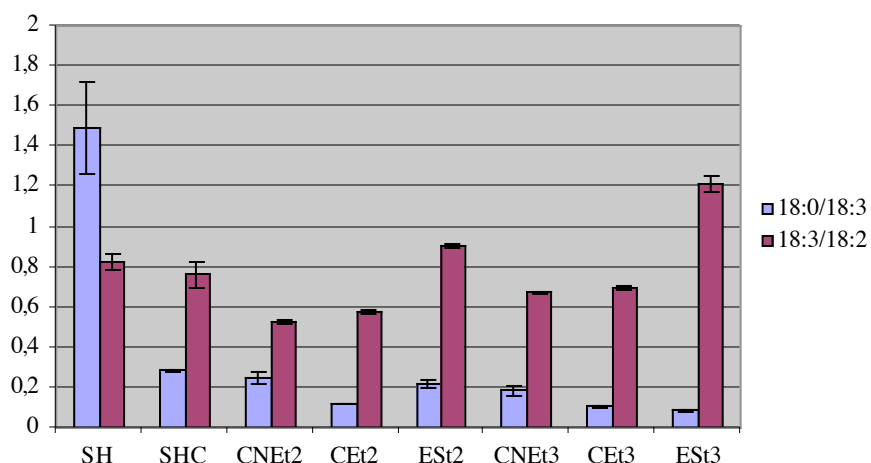


Figura V.13 – Razões calculadas entre 18:0 e 18:3, e entre 18:3 e 18:2, nas diferentes amostras. Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

Os *calli*  $t_3$  mostraram um valor intermédio entre SH e *calli*  $t_2$ . O valor máximo foi encontrado em ESt<sub>3</sub>, ( $P \leq 0,001$  relativamente aos restantes tecidos) seguido de ESt<sub>2</sub> que não é estatisticamente diferente do obtido em SH (Tabela V.8).

A razão 18:0/18:3 diminuiu dramaticamente com a desdiferenciação e apresentou valores significativamente mais baixos em CE comparativamente aos de CNE, sendo a diferença muito significativa em  $t_2$ . Os valores mínimos foram precisamente observados em CE e em ESt<sub>3</sub> (Tabela V.8 e fig. V.13).

## 2.3 – Padrões de variação dos ácidos gordos livres (AGL)

### 2.3.1 – Análise de componentes principais dos AGL

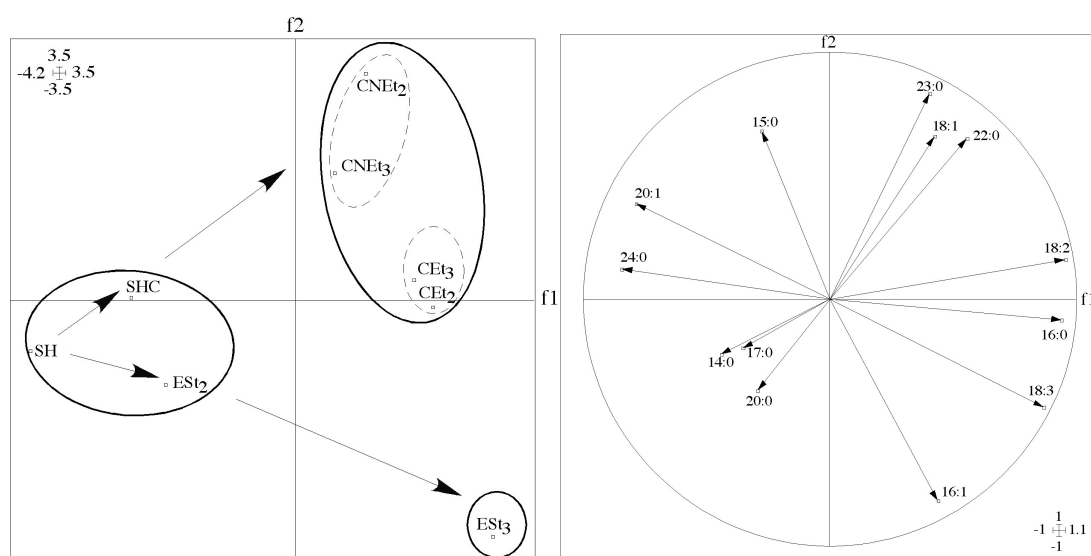
Todos os elementos da Tabela V.7 foram incluídos na análise de componentes principais (PCA) à exceção do ácido esteárico (18:0) por não ter apresentado variação significativa ao longo do período experimental. Do resultado da análise foram escolhidos os 3 primeiros factores – f1, f2 e f3 – que explicaram um total de 79 % da variabilidade dos dados. A multicolinearidade foi globalmente baixa, havendo 4 variáveis muito correlacionadas ( $r > 0,8$ ) (Tabela V.9 – Apêndice C). O AGL 16:0 está correlacionado positivamente com 18:2 e 18:3 e negativamente com 24:0. Este último está correlacionado negativamente com 18:2.

Das análises realizadas vamos apresentar e discutir a **distribuição das variáveis independentes** nos **planos factoriais** obtidos por combinações 2 a 2 dos factores escolhidos (f1, f2 e f3), que revela o grau de proximidade das diferentes variáveis baseada na composição em AGL (figs. V.14, V.16 e V.18), e os respectivos **círculos de correlação**, cujo padrão de **distribuição das variáveis dependentes** revela a contribuição relativa destas para a definição de cada eixo ou factor extraído da PCA (figs. V.15, V.17 e V.19).

O plano factorial definido pelos eixos f1 e f2 (fig. V.14), que explicaram 63 % da variabilidade total, separou as variáveis independentes em 3 conjuntos principais:

- Explantes primários (SH), explantes com desdiferenciação de tecidos e crescimento incipiente de *callus* (SHC) e embriões jovens (ESt<sub>2</sub>) – definidos com base essencialmente em (-)f1 (parte negativa do eixo f1);
- *Calli* – com base na combinação vectorial (+)f1/(+)f2; e
- Embriões mais desenvolvidos (ESt<sub>3</sub>) – com base na combinação (+)f1/(-)f2.

Este mapa factorial f1-f2 evidenciou uma separação nítida de diferentes tipos de tecidos – *calli* vs. embriões somáticos e hipocótilos – e ainda de diferentes fases do desenvolvimento dos ES – fase mais precoce vs. mais tardia. Verificou-se ainda que os embriões mais jovens (ESt<sub>2</sub>) se assemelharam mais, do ponto de vista da composição em AGL, aos explantes primários do que aos embriões mais desenvolvidos (ESt<sub>3</sub>) (fig. V.14). No conjunto dos *calli*, a distribuição sugere ainda a constituição de 2 subconjuntos coerentes: *calli* embriogénicos vs. não-embriogénicos, separados essencialmente segundo f2.

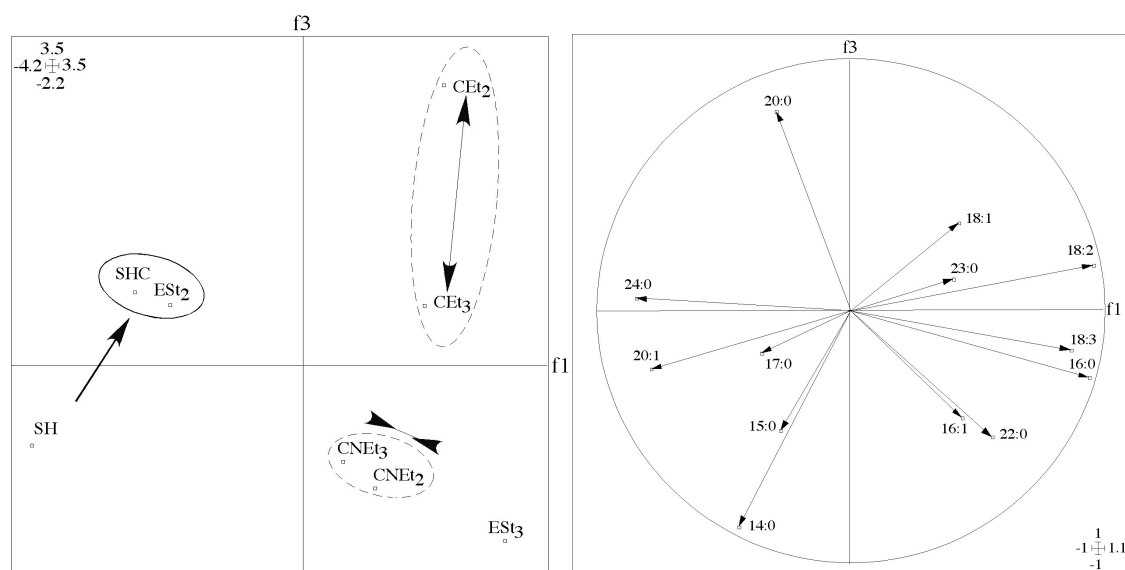


Figuras V.14 e V.15 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes (amostras) no mapa factorial f1-f2 obtido com PCA dos AGL; e respectivo círculo de correlações.

Ao analisar-se o círculo de correlação definido pelos factores f1 e f2 (fig. V.15) verificou-se que estes foram gerados por combinação de vários AGL. O eixo f1 foi definido basicamente por 16:0, 18:2 e 18:3 (com uma correlação positiva com o eixo) e por 20:1 e 24:0 (com uma correlação negativa com o eixo), e o eixo f2, essencialmente por 15:0, 23:0 e 18:1 (correlação positiva) e por 16:1 (correlação negativa). Daqui pode deduzir-se que a cisão entre *calli* e tecidos diferenciados (SH, SHC e ESt<sub>2</sub> com excepção de ESt<sub>3</sub>) se explicou essencialmente à custa do factor 1, tendo os *calli* um maior teor de AGL principais (palmítico, linoleico e linolénico) e menor de 20:1 e 24:0. Os ESt<sub>3</sub> destacaram-se de *calli* porque apresentaram um f1 mais elevado mas também porque foram definidos por (-)f2, e portanto com teores mais elevados de 16:0, 16:1 e 18:3 principalmente, e mais baixos de 15:0, 18:1 e 23:0 (Tabela V.7 e fig. V.15). Neste plano factorial, os *calli* embriogénicos apresentaram teores mais elevados de 16:1, 18:2 e 18:3 e mais baixos de 15:0, 20:1 e 24:0 (Tabela V.7 e figs. V.14 e V.15). A separação entre embriões deu-se fundamentalmente segundo o eixo f1. Durante o seu desenvolvimento houve um aumento muito significativo nos AGL 16:0 e polinsaturados do ácido esteárico e uma diminuição nos ácidos 20:1 e 24:0.

Representando as variáveis independentes no mapa factorial f1-f3 (fig. V.16), constatou-se que o reagrupamento de variáveis não foi muito diferente. Os *calli*

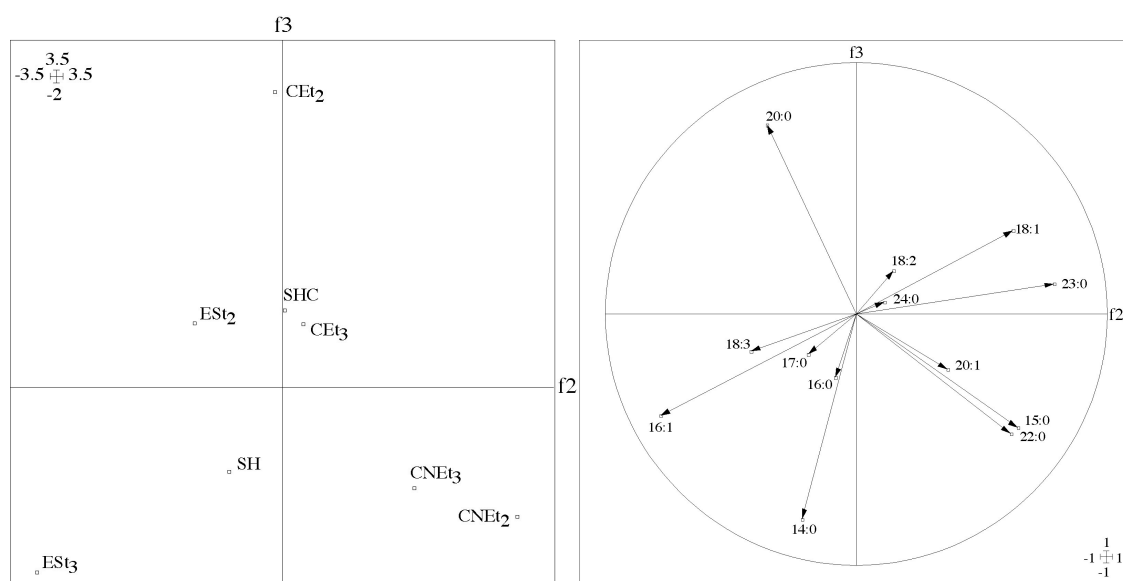
separaram-se com base na sua capacidade embriogénica, neste plano mais próximos os *calli* não-embriogénicos e mais afastados os embriogénicos, segundo f3 (fig. V.16). A separação entre SH e SHC, já visível no plano f1-f2, dilatou-se, revelando que a indução e crescimento de *callus* a partir dos explantes correspondeu não só a uma fase de transição morfológica, mas também de transição metabólica.



Figuras V.16 e 1 V.7 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes (amostras) no mapa factorial f1-f3 obtido com PCA dos AGL; e respectivo círculo de correlações.

Para explicar este novo padrão de distribuição recorreu-se ao círculo de correlação dos AGL com o plano f1-f3 e verificou-se que, além das diferenças explicadas por f1, os AGL responsáveis por esta distribuição foram basicamente 14:0 e 20:0 (fig. V.17). Os *calli* embriogénicos apresentaram maior teor de 20:0 e menor de 14:0 comparativamente aos não-embriogénicos (figs. V.16 e V.17).

Com o plano f2-f3 não se obtiveram outras reordenações relevantes (fig. V.18) mas, por razões que se prendem com a coerência da informação fornecida, representou-se o círculo de correlação das variáveis neste plano factorial (fig. V.19).



Figuras V.18 e V.19 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes (amostras) no mapa factorial f2-f3 obtido com PCA dos AGL; e respectivo círculo de correlações.

Com base nesta abordagem de tratamento dos dados, verificou-se que a composição e teor específicos em AGL permitiu separar os tecidos amostrados em conjuntos bastante coerentes. Este resultado permitiu verificar que ocorre, não só uma variação química ontogénica, patente na separação dos embriões somáticos em fases distintas, como ocorre uma variação química associada à capacidade embriogénica dos *calli*. SH, SHC e Est<sub>2</sub> parecem ter composições em AGL fundamentalmente diferentes dos restantes tecidos, tendo surgido relativamente próximos. É muito difícil atribuir significados biológicos precisos a alterações tão díspares nos teores de uma tão variada gama de AGL. Em traços gerais, e no que diz respeito aos AGL, pode-se contudo dizer que:

- a indução e desenvolvimento de *calli* a partir de segmentos de hipocótilo de linho envolve uma alteração do metabolismo dos ácidos gordos;
- existem diferenças significativas associadas à capacidade embriogénica dos *calli*;
- há semelhança na composição dos AGL entre embriões somáticos muito jovens e os explantes primários; e
- há diferenças muito relevantes na composição dos AGL entre embriões somáticos em duas fases de desenvolvimento diferentes.

### 2.3.2 – Análise de componentes principais de parâmetros obtidos a partir de AGL

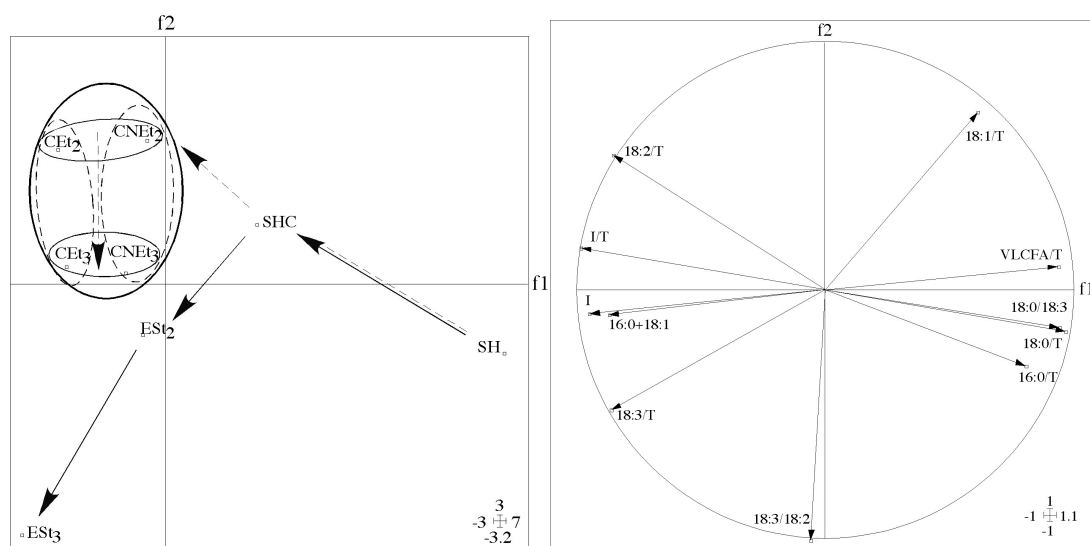
Com o mesmo objectivo de utilizar a análise multivariada para estudar a importância relativa das variáveis dependentes na explicação duma estrutura latente dos dados, aplicou-se a técnica de análise de componentes principais aos parâmetros obtidos a partir dos AGL individuais e descritos na Tabela V.8. Devido à natureza dos dados, algumas variáveis apresentaram elevada redundância. Após análise preliminar, foram excluídas desta PCA aquelas que apresentaram correlação superior a 0,990 com outras variáveis. Nestas condições encontravam-se as variáveis referidas na Tabela V.8: **AGL totais (T)** e **PUFAs** (redundantes com **AGL insaturados (I)**), e **AGL insaturados/AGL saturados (I/S)** e **PUFAs/AGL totais (PUFAs/T)** (redundantes com **AGL insaturados/AGL totais (I/T)**). As variáveis **AGL saturados (S)** e **VLCFAs** foram igualmente retiradas por não terem apresentado variação estatisticamente significativa nos diferentes tecidos ao longo do ensaio.

A Tabela V.10 (Apêndice C) representa a hemi-matriz de correlação correspondente a esta análise. A multicolinearidade foi, como seria de esperar, mais alta, visto haver maior redundância e maior grau de dependência entre algumas variáveis relativamente às variáveis da PCA anterior. No entanto, como o recurso a esta técnica estatística não teve como objectivo descartar variáveis redundantes, mas descobrir as variáveis que melhor explicassem os fenómenos em estudo, mantiveram-se algumas variáveis que considerámos pertinentes.

Com estes dados foram escolhidos apenas os 2 primeiros factores (f1 e f2), já que estes, por si só, conseguiram explicar a quase totalidade da variabilidade, *ca.* 90 %. Da análise do mapa factorial (fig. V.20) verificou-se que a ordenação das variáveis independentes com base neste novo conjunto de variáveis dependentes, definiu no plano, dois “percursos” cronológicos principais:

- um associado ao desenvolvimento morfogénico (SH m SHC m ESt<sub>2</sub> m ESt<sub>3</sub>), que permitiu reconhecer e seguir uma ontogénese química associada à ontogénese morfológica (ver setas a cheio, fig. V.20); e
- um outro associado à desdiferenciação dos tecidos, indução e crescimento de *calli* (SH m SHC m *Calli* t<sub>2</sub> m *Calli* t<sub>3</sub>) que permitiu despistar que a indução e crescimento de tecidos indiferenciados segue uma ontogénese metabólica diferente da morfológica (ver setas a tracejado, fig. V.20).

Com base neste plano, os *calli* formaram um grupo relativamente coeso definido no quadrante (-)f1/(+f2) (conjunto delimitado por traço grosso, fig. V.20). Os *calli* foram ainda subagrupados com base no tempo em cultura ou com base na sua capacidade embriogénica (ver conjuntos a traço fino e tracejado, respectivamente, fig. V.20).



Figuras V.20 e V.21 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes (amostras) no mapa factorial f1-f2 da PCA dos parâmetros obtidos a partir de AGL; e respectivo círculo de correlações.

A separação dos *calli*  $t_2$  e  $t_3$  foi contudo mais notória que a separação com base na capacidade embriogénica. Este facto sugere que o factor tempo, mais do que a embriogénese somática, foi, do ponto de vista das alterações químicas analisadas, determinante na estruturação dos dados. Ao contrário do que se tinha observado na PCA com os AGL individuais, verificou-se que *SHC* e *ES* mais jovens ( $t_2$ ) se encontram próximos dos *calli*, tendo-se mantido os *ES* mais desenvolvidos ( $t_3$ ), bastante isolados dos restantes tecidos (fig. V.20). Ao analisar o círculo de correlação no plano f1-f2 (fig. V.21), verificou-se que a maior parte das variáveis se encontrava bastante correlacionada com o eixo f1 – *VLCFA/T*, *16:0/T*, *18:0/T*, *18:0/18:3* correlacionadas positivamente e, *I/T*, *I*, *16:0+18:1*, *18:2/T* e *18:3/T* correlacionadas negativamente. O eixo f2 ficou praticamente definido à custa de *18:3/18:2*, embora *18:1/T* também tenha apresentado uma correlação razoável com este eixo, sendo neste caso, uma correlação positiva (fig. V.21).



Com base nestes resultados (figs. V.20 e V.21) podemos então dizer que as variações ontogénicas ao nível dos AGL associadas à formação de plântulas por embriogénese somática, se podem traduzir sumariamente por:

- diminuição significativa nas proporções dos AGL saturados de cadeia longa e dos VLCFA, em favor dos AGL insaturados, durante as primeiras fases de desdiferenciação dos explantes (SH m SHC);
- manutenção dessa tendência nos ES jovens, com a diferença de que 18:1/T diminui relativamente a SHC; e
- incremento dessa tendência com o posterior desenvolvimento das plântulas, com destaque para o aumento da proporção de 18:3, o qual se traduz no aumento muito significativo do parâmetro 18:3/18:2.

Relativamente ao “percurso” cronológico que leva à formação de *calli*, a partir de explantes sub-cotiledonares de linho, verificou-se que:

- a desdiferenciação dos explantes e crescimento de *callus* (SH m SHC) foi acompanhada de importantes alterações no teor relativo dos AGL;
- durante o crescimento exponencial dos *calli* (SHC m *Calli* t<sub>2</sub>) manteve-se a variação observada durante a fase anterior, ocorrendo fundamentalmente uma diminuição muito significativa da razão 18:3/18:2 devido ao aumento da proporção de 18:2 nestes tecidos (Tabela V.8 e figs. V.20 e V.21); e
- durante a passagem a uma fase de crescimento mais estacionária (*Calli* t<sub>2</sub> m *Calli* t<sub>3</sub>), os *calli* acompanharam alterações observadas durante o desenvolvimento dos embriões somáticos (ESt<sub>2</sub> m ESt<sub>3</sub>), nomeadamente o aumento da razão 18:3/18:2 e a diminuição da razão 18:1/T, ácidos gordos associados ao eixo f2 (Tabela V.8 e figs. V.20 e V.21).

Estes resultados vieram mostrar que o parâmetro 18:3/18:2 permite, não só, separar os ES em diferentes fases do seu desenvolvimento, como também, separar os *calli* com base na sua fase de crescimento ou estado fisiológico. A separação entre os *calli* com base na sua capacidade embriogénica não foi, nesta análise, tão notória como com a PCA dos AGL individuais, mas verificou-se que os *calli* embriogénicos se assemelharam mais aos embriões somáticos t<sub>3</sub> que os não-embriogénicos, levando a

supôr que as diferenças relativas à fracção de AGL, associadas ao eixo f1, ocorridas nos embriões durante o seu desenvolvimento, foram também experimentadas pelos *calli* embriogénicos relativamente aos não-embriogénicos (Tabela V.8 e figs. V.20 e V.21).

### 3 – Ácidos gordos esterificados (AGE)

#### 3.1 – Identificação

Identificaram-se 15 ácidos gordos esterificados, nove saturados – 12:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 23:0 e 24:0 – e seis insaturados – 16:1, 18:1, 18:2, 18:3, 20:1 e 22:1. Para o material vegetal amostrado, os AGE identificados, os respectivos teores médios e erros padrão (SE) estimados encontram-se representados na Tabela V.11. Na Tabela V.12, e à semelhança do que foi feito para os AGL, estão representados os somatórios totais e parciais e relações específicas entre AGE.

Tabela V.11 – Teores de ácidos gordos esterificados (AGE) quantificados nas fracções neutras obtidas a partir dos diferentes tecidos (SH, SHC, CNE, CE e ES) colhidos nas 4 amostragens feitas ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ). Encontram-se representados para cada composto, o seu tempo de retenção na coluna (TR) nas condições de operação em GC, o valor médio estimado (mg/g lípidos totais) e o respectivo erro padrão (SE) entre parêntesis.

Compostos (AGE)	TR (min.)	Amostras (tempo de amostragem)							
		SH ( $t_0$ )	SHC ( $t_1$ )	CNE ( $t_2$ )	CE ( $t_2$ )	ES ( $t_2$ )	CNE ( $t_3$ )	CE ( $t_3$ )	ES ( $t_3$ )
12:0	6,14	25 (2,7)	14 (1,6)	17 (4,1)	4,5 (0,39)	17 (2,3)	nd	nd	3,2 (-)
14:0	9,37	4,1 (0,52)	3,0 (0,25)	nd	1,7 (-)	nd	1,4 (0,11)	2,2 (-)	1,4 (0,26)
16:0	13,09	12 (2,3)	34 (2,2)	43 (4,8)	42 (2,0)	21 (1,6)	23 (2,4)	39 (0,6)	18 (5,9)
16:1	13,54	3,1 (0,37)	nd	nd	3,9 (0,11)	5,6 (-)	2,3 (0,24)	4,7 (0,03)	6,6 (2,47)
17:0	14,94	nd	nd	nd	nd	8,3 (-)	nd	nd	nd
18:0	16,67	5,7 (1,60) 5	8,3 (0,69)	11 (1,4)	8,8 (0,27)	11 (0,9)	4,9 (1,06)	6,8 (0,190)	4,5 (0,99)
18:1	16,93	4,3 (0,71)	12 (1,4)	15 (2,7)	11 (0,5)	nd	4,4 (0,31)	7,1 (0,69)	2,2 (0,71)
18:2	17,72	6,4 (0,16)	58 (5,5)	77 (12,7)	74 (4,3)	31 (4,8)	36 (3,6)	65 (0,2)	34 (14,3)
18:3	18,79	4,0 (0,29)	33 (1,6)	49 (6,9)	52 (3,6)	22 (2,4)	28 (3,2)	51 (1,8)	37 (18,2)
20:0	20,02	nd	4,0 (-)	nd	4,1 (0,48)	8,7 (-)	2,1 (0,20)	4,9 (0,53)	2,1 (-)
20:1	20,87	4,5 (2,09)	3,9 (0,52)	5,4 (0,81)	2,4 (0,54)	4,5 (1,22)	0,99 (0,003)	2,0 (-)	1,2 (0,58)
22:0	23,42	nd	nd	nd	4,8 (-)	nd	nd	nd	nd
22:1	23,81	6,9 (-)	5,3 (-)	nd	9,1 (-)	11 (0,62)	2,1 (0,98)	5,2 (-)	2,8 (-)
23:0	24,72	nd	6,9 (3,12)	nd	5,6 (2,89)	nd	2,6 (0,29)	7,8 (2,97)	2,8 (-)
24:0	26,17	nd	6,3 (0,53)	11 (1,6)	6,6 (0,16)	nd	5,3 (0,32)	8,9 (1,27)	4,9 (-)

(-) devido à impossibilidade técnica de se quantificar um dos duplicados não se estimou medida de erro.  
nd – não detectado.

Tabela V.12 – Somatórios (total e parciais) e relações entre AGE quantificados nas frações neutras obtidas a partir dos diferentes tecidos (SH, SHC, CNE, CE e ES) colhidos nas 4 amostragens feitas ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ). Encontram-se representados para cada variável, o valor médio estimado a partir dos duplicados e o respectivo desvio padrão (SD) entre parêntesis. No caso dos somatórios, os valores estão expressos em mg/g de lípidos totais; no caso das proporções os valores são adimensionais tendo, nalguns casos, como base, o somatório dos AGE totais (T).

Variáveis	Amostras (tempo de amostragem)							
	SH ( $t_0$ )	SHC ( $t_1$ )	CNE ( $t_2$ )	CE ( $t_2$ )	ES ( $t_2$ )	CNE ( $t_3$ )	CE ( $t_3$ )	ES ( $t_3$ )
AGE totais (T)	73 (2,6)	183 (8,5)	228 (49,5)	222 (7,0)	127 (0,9)	113 (16,5)	199 (2,8)	113 (66,9)
AGE insaturados (I)	26 (0,2)	109 (9,0)	146 (32,8)	148 (3,5)	72 (13,3)	74 (11,0)	131 (3,0)	83 (53,2)
AGE saturados (S)	47 (2,4)	74 (0,5)	82 (16,8)	74 (3,5)	56 (14,2)	39 (5,4)	68 (5,7)	30 (13,7)
PUFAs	10 (0,6)	91 (10,1)	125 (27,8)	126 (11,2)	53 (10,2)	64 (9,6)	116 (2,9)	71 (45,9)
VLCFAs	8,0 (1,96)	22 (9,4)	17 (3,4)	26 (7,4)	20 (7,0)	13 (1,7)	25 (1,7)	7,3 (9,4)
VLCFAs (saturados)	0,0 (0,0)	15 (6,4)	11 (2,2)	19 (0,3)	4,4 (6,17)	10 (0,3)	22 (6,8)	4,7 (6,58)
PUFAs/T	0,14 (0,004)	0,49 (0,032)	0,55 (0,002)	0,57 (0,033)	0,42 (0,083)	0,57 (0,002)	0,58 (0,006)	0,62 (0,039)
I/S	0,55 (0,023)	1,5 (0,13)	1,8 (0,04)	2,0 (0,05)	1,4 (0,58)	1,9 (0,02)	1,9 (0,21)	2,6 (0,58)
I/T	0,36 (0,010)	0,59 (0,021)	0,64 (0,005)	0,67 (0,005)	0,56 (0,109)	0,65 (0,002)	0,66 (0,024)	0,72 (0,046)
VLCFAs (sat.)/T	0,0 (0,0)	0,083 (0,0389)	0,049 (0,0009)	0,084 (0,0038)	0,034 (0,0482)	0,09 (0,0102)	0,11 (0,032)	0,029 (0,0411)
16:0/T	0,17 (0,039)	0,18 (0,009)	0,19 (0,011)	0,19 (0,007)	0,16 (0,019)	0,20 (0,010)	0,19 (0,001)	0,17 (0,026)
18:0/T	0,078 (0,0283)	0,045 (0,0032)	0,050 (0,0026)	0,040 (0,0004)	0,079 (0,0090)	0,043 (0,0070)	0,034 (0,0018)	0,043 (0,0013)
18:1/T	0,059 (0,0117)	0,063 (0,0075)	0,065 (0,0029)	0,051 (0,0048)	0,0 (0,0)	0,039 (0,0018)	0,036 (0,0048)	0,020 (0,0032)
18:2/T	0,088 (0,00004)	0,31 (0,028)	0,34 (0,006)	0,33 (0,017)	0,24 (0,055)	0,32 (0,002)	0,33 (0,003)	0,30 (0,001)
18:3/T	0,055 (0,0036)	0,18 (0,004)	0,21 (0,003)	0,23 (0,016)	0,17 (0,028)	0,25 (0,004)	0,25 (0,009)	0,32 (0,040)
18:3/18:2	0,63 (0,041)	0,58 (0,040)	0,64 (0,021)	0,70 (0,012)	0,71 (0,043)	0,77 (0,018)	0,78 (0,035)	1,04 (0,13)

AGE – ácidos gordos esterificados; PUFAs – ácidos gordos polinsaturados; VLCFA – ácidos gordos de cadeia muito longa.

### 3.2 – Variação ontogénica dos teores específicos de cada composto das fracções de AGE

Os conteúdos intracelulares de AGE totais variaram com a evolução das culturas (Tabela V.12). Os teores específicos dos AGE totais aumentaram muito significativamente com o início da desdiferenciação e concomitante produção de *callus* (SHC), atingindo um valor máximo de *ca.* de 225 mg/g lípidos totais em *calli* jovens ( $t_2$ ) independentemente da sua capacidade embriogénica, valor este que não foi significativamente diferente do de SHC. Após mais duas semanas de cultura ( $t_3$ ) verificou-se, no entanto, uma diferença significativa entre os dois tipos de *calli* (CE e CNE). Em  $t_3$  os *calli* embriogénicos mantiveram um teor semelhante ao que se registava em  $t_2$  mas os não-embriogénicos sofreram uma redução para *ca.* de metade do valor existente em  $t_2$  (Tabela V.12). Os teores de AGE totais em  $EST_3$  apresentavam-se no mesmo nível dos registados em  $CNEt_3$  mantendo-se idênticos aos registados em  $EST_2$  (Tabela V.12).

Como se pode ver pela Tabela V.12 e figura V.22a, dum modo geral, os teores de AGE insaturados seguiram um padrão de variação muito semelhante ao dos AGE totais, representando *ca.* de 72 % destes.

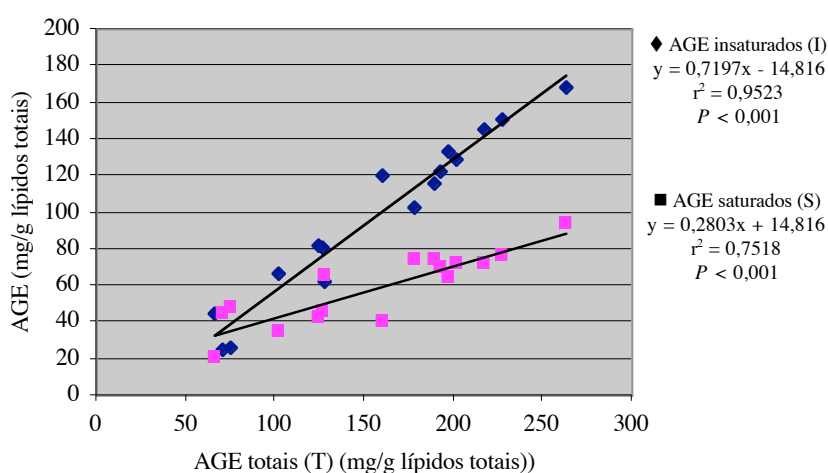


Figura V.22 a – Relação entre os AGE insaturados (I) e saturados (S) com os AGE totais (T). A equação das rectas e os respectivos valores de  $r^2$  e  $P$ , encontram-se na legenda.

Tal como se tinha verificado para os AGL, a soma dos teores dos PUFAs esterificados (18:2 e 18:3), constituiu a maior parte da fracção dos AGE insaturados (fig. V.22b). Os pequenos desvios padrão (SD) observados mostraram ainda que a variação ocorrida nos PUFAs foi praticamente paralela à variação ocorrida nos AGE insaturados (Tabela V.12 e fig. V.22b).

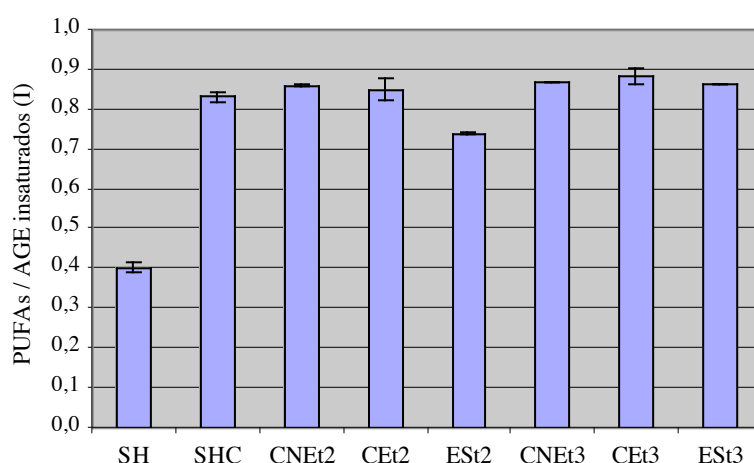


Figura 22 b – Razão entre PUFAs e AGE insaturados nas diferentes amostras. Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

No entanto, comparativamente aos AGL, a fracção de PUFAs esterificados foi menor. Esta variou entre 83 e 88 % nos *calli* e embriões (contra os 90-96 % obtidos com os AGL), tendo-se verificado a maior diferença nos explantes primários (SH), onde aquela fracção foi de apenas 40 % (contra os 72 % nos AGL) (fig. V.11b e V.22b). Isto significa que, não só os AGE são mais diversos que os AGL, mas também que a produção de ésteres nas primeiras fases do desenvolvimento de *calli* é muito activa. Outra diferença importante entre AGL e AGE, no que diz respeito à fracção de polinsaturados, foi encontrada nos ESt<sub>2</sub>. Enquanto os embriões jovens apresentaram uma fracção de PUFAs livres semelhante à dos embriões mais desenvolvidos (fig. V.11b), a fracção de PUFAs esterificados em ESt<sub>2</sub> foi significativamente menor que a registada em ESt<sub>3</sub> (fig. V.22b). Este resultado parece indicar que a síntese de ésteres de PUFAs estará comprometida nos embriões mais jovens apesar de não haver limitações ao nível da disponibilidade de PUFAs livres.

A variação de AGE saturados foi de menor amplitude e apesar de se poderem correlacionar linearmente com os AGE totais, verificou-se que o ajuste não foi tão estreito como o dos AGE insaturados (ver regressões, fig. V.22a). O teor deste tipo de compostos nos explantes primários foi mais elevado que nos restantes tecidos. O conteúdo de AGE saturados, diminuiu de  $EST_2$  para  $EST_3$ , ao contrário do que se observou com os AGE totais e insaturados (Tabela V.12). Devido ao comportamento diferencial destes compostos esterificados durante o processo ontogénico, foi possível distinguir 3 grupos com base na razão AGE insaturados/AGE saturados (I/S):

- segmentos de hipocótilo (SH) com o valor mínimo;
- $EST_3$  com um valor máximo; e
- restantes tecidos com um valor intermédio (Tabela V.12 e fig. V.23).

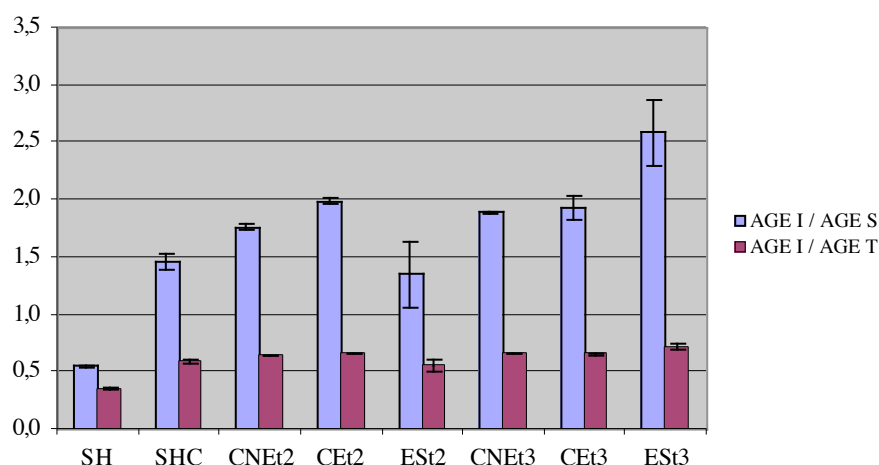


Figura V.23 – Razões calculadas entre AGE insaturados (I) e saturados (S), e entre AGE insaturados (I) e AGE totais (T), nas diferentes amostras. Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

Menor variação foi verificada na razão AGE insaturados/AGE totais (I/T) nas fracções estudadas. Valores mínimos desta razão foram igualmente registados nos explantes primários (35 %) ao passo que em *calli* e embriões foram registados valores de 56 a 72 %. Estes valores limite correspondem aos teores observados nos embriões, tendo os mais desenvolvidos ( $EST_3$ ) um teor significativamente superior aos dos menos desenvolvidos ( $EST_2$ ) (Tabela V.12 e fig V.23). Genericamente, os *calli* apresentaram

um valor médio de 65 % ( $\pm 1,1$  %) e uma razão PUFAs/AGE totais de 57 % ( $\pm 1,27$  %) (cálculos a partir da Tabela V.12).

Nem todas as amostras de AGE continham todos os VLCFA identificados (Tabela V.11). Isso explica a grande variabilidade (medida pelo SD) observada dentro das amostras no que diz respeito à estimativa do teor dos VLCFAs totais (Tabela V.12 e fig. V.24). Do que se infere da Tabela V.12 e da figura V.24 verifica-se que não foram detectados VLCFA saturados esterificados nos explantes primários (SH), embora na forma livre eles se encontrassem presentes (Tabela V.8). Estes constituintes da fracção éster surgiram durante a desdiferenciação dos explantes primários e apresentaram um valor máximo nos *calli* embriogénicos. Os restantes tecidos apresentaram valores semelhantes, à volta de 10 mg/g lípidos totais (fig. V.24). Este resultado não teve paralelo nos AGL (Tabela V.8).

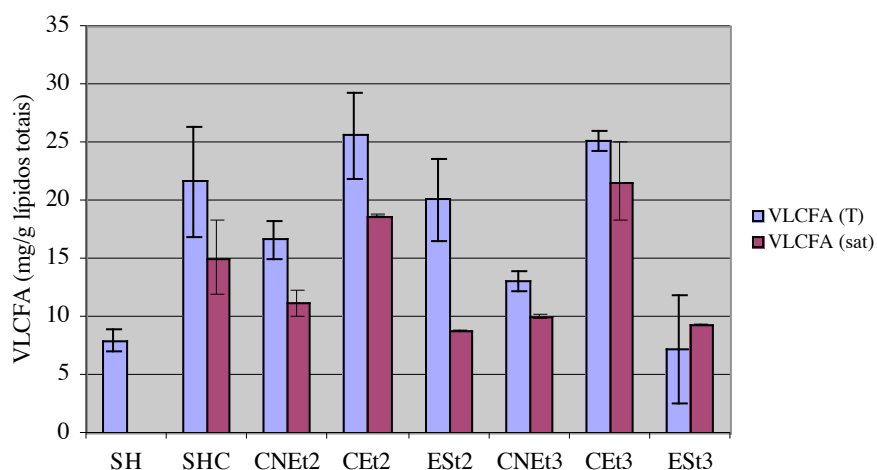


Figura V.24 – Teores de VLCFA saturados (VLCFA sat) e VLCFA totais (VLCFA T), obtidos a partir das fracções éster, nas diferentes amostras. Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

Os VLCFAs saturados apresentaram uma variação semelhante à dos VLCFAs totais, constituindo os VLCFA maioritários na fracção éster (Tabela V.12 e fig. V.24). Os VLCFAs monoinsaturados foram os únicos presentes na fracção éster dos explantes e foram também os maioritários nos embriões somáticos jovens (fig. V.24).



De acordo com os dados da Tabela V.11, podemos constatar que nem todos os ácidos gordos identificados na fracção éster se encontravam representados em todos os tecidos amostrados. Apenas os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolénico foram quantificados em todas as amostras e replicados. Alguns casos excepcionais podem ainda ser observados: o ácido pentadecanóico (15:0) não foi detectado na fracção éster de nenhuma das amostras, embora tivesse sido detectado na forma livre (Tabela V.7); o ácido heptadecanóico (17:0) foi identificado só em embriões jovens (ESt<sub>2</sub>); e o ácido docosanóico (22:0) apenas em CEt<sub>2</sub>. Na fracção éster foi possível distinguir dois tipos de padrão de variação dos AGE maioritários: um tipo onde se incluem o 16:0 e os PUFAs, com uma amplitude de variação elevada; e outro constituído pelos ácidos 18:0 e 18:1, apresentando teores mais baixos e menores amplitudes de variação (Tabela V.11 e fig. V.25).

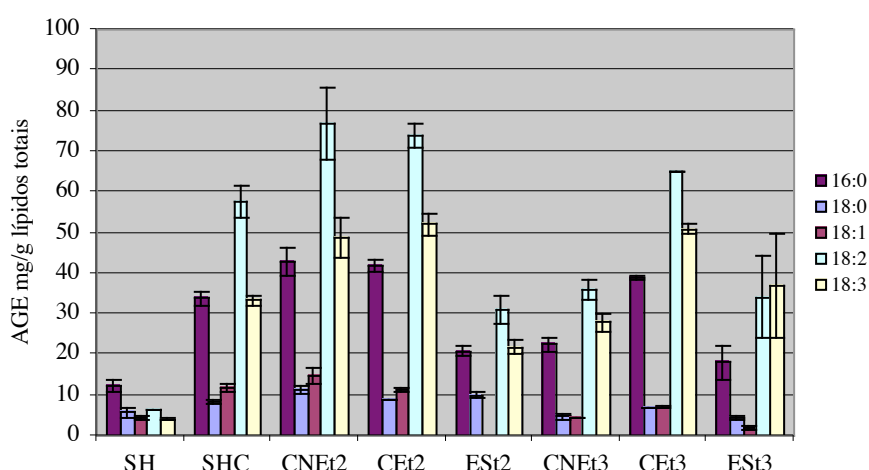


Figura V.25 – Teores de 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 esterificados nas diferentes amostras (representados graficamente segundo esta ordem). Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

Relativamente ao primeiro grupo houve um aumento muito significativo nas primeiras fases da desdiferenciação dos explantes primários e consequente indução e crescimento de *callus*, tendo sido sucessivamente maior para 16:0, 18:3 e 18:2 (fig. V.25). Esta variação tão acentuada destes AGE nas primeiras fases de desdiferenciação e desenvolvimento de *calli* (SH m SHC), não foi contudo acompanhada por um aumento

paralelo nos AGL correspondentes, os quais parecem ter surgido com maior abundância apenas nos *calli* em  $t_2$  (Tabelas V.7 e V.11). O valor máximo de 16:0 e de PUFA's foi observado em SHC, em *calli*  $t_2$ , independentemente da sua capacidade embriogénica, e em CE $t_3$ . De  $t_2$  para  $t_3$  ocorreu uma diminuição destes AGE apenas em *calli* não-embriogénicos passando a haver, portanto, uma diferença significativa entre CE $t_3$  e CNE $t_3$ . Os valores obtidos nos embriões foram semelhantes nas duas amostragens e aproximadamente metade dos obtidos nos *calli* de que derivaram (Tabela V.11 e fig. V.25). Os AGE do segundo grupo (18:0 e 18:1) decresceram, quer em CE quer em CNE, não havendo diferenças relevantes entre os dois tipos de *calli*. Concretamente, 18:0 não sofreu variações apreciáveis ao longo dos dois primeiros períodos, diminuindo de  $t_2$  para  $t_3$  em todos os tecidos (Tabela V.11 e fig. V.25) ao passo que 18:1 sofreu um aumento relativamente pequeno durante a desdiferenciação e apresentou valores muito baixos ou mesmo nulos nos embriões (Tabela V.11 e fig. V.25). Na realidade, este ácido gordo não se acumulou nos ES jovens, nem na forma esterificada nem na forma livre (Tabelas V.8 e V.11). Os restantes AGE apresentaram um comportamento mais aleatório, não se constituindo outros grupos homogêneos. Os valores obtidos para 12:0, 14:0, 20:0, 20:1 e 24:0 estão representados na figura V.26.

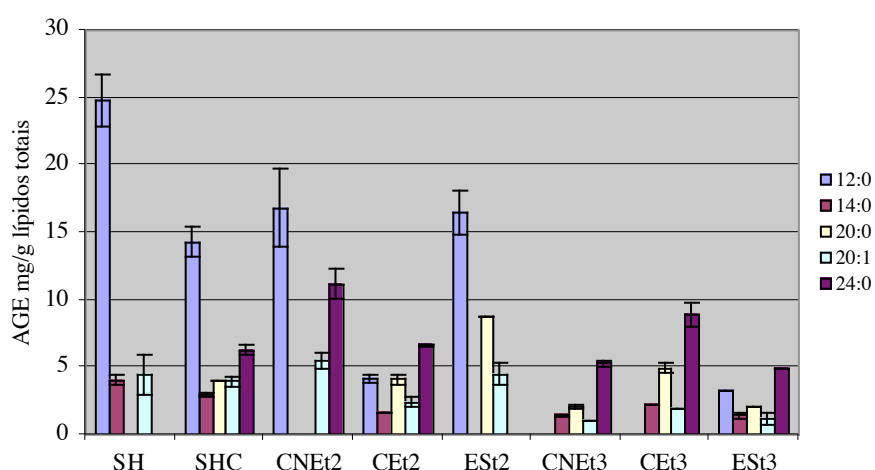


Figura V.26 – Teores de 12:0, 14:0, 20:0, 20:1 e 24:0 esterificados nas diferentes amostras (representados graficamente segundo esta ordem). Em cada coluna encontra-se representada a barra de desvio padrão (SD) respectiva.

Apesar da aparente variação errática, há pormenores que importa destacar: os AGE de cadeia mais curta estiveram melhor representados nas primeiras fases, especialmente em SH; os teores de 12:0, 20:1 e 24:0 em CNEt<sub>2</sub> eram significativamente mais elevados que em CEt<sub>2</sub>; 14:0 e 24:0 não foram detectados em ESt<sub>2</sub> mas, pelo contrário, 12:0, 20:0 e 20:1 representaram um grupo importante em ESt<sub>2</sub>, tendo os respectivos teores específicos decrescido significativamente de ESt<sub>2</sub> para ESt<sub>3</sub>. Contrariamente aos AGE 12:0, 20:1 e 24:0, os monoinsaturados 16:1 e 22:1 foram mais abundantes em CE que em CNE, onde nem sequer foram detectados (Tabela V.11). À excepção de 20:0, os VLCFA saturados não se encontraram nos ESt<sub>2</sub>. Pelo contrário, os VLCFA monoinsaturados 20:1, e particularmente o 22:1, foram especialmente relevantes nestes embriões havendo posteriormente uma redução significativa nos ESt<sub>3</sub>.

Nas fracções éster de todos os tipos de material vegetal foram detectados teores mais elevados de 18:2 do que de 18:3, à excepção de ESt<sub>3</sub>, onde a razão 18:3/18:2 (> 1) foi significativamente maior que nos restantes tecidos (Tabelas V.11 e V.12 e fig. V.25). No processo de desdiferenciação, o aumento do teor de 18:2 foi mais rápido que o de 18:3, mas ao longo do crescimento dos embriões e dos *calli*, o aumento de 18:3 foi maior proporcionalmente a 18:2 (fig. V.25) aumentando a razão 18:3/18:2 de t<sub>2</sub> para t<sub>3</sub> (Tabela V.12). O mesmo se verificou para os AGL (Tabela V.8).

Quando se comparam os valores dos AGE principais como proporção dos AGE totais, com os seus valores absolutos verifica-se um diferente padrão de variação (Tabela V.12). Não houve variação significativa da proporção de 16:0 (16:0/T), constituindo este composto, 16 a 20 % do total de AGE em qualquer dos tecidos estudados. 18:0/T apresentou valores máximos em SH e ESt<sub>2</sub> (ca. de 8 %) e valores significativamente mais baixos nos restantes tecidos (3,4 a 5,0 %). 18:1/T apresentou valores máximos nos tecidos mais jovens (SH, SHC e *calli* t<sub>2</sub>), constituindo 5 a 6,5 % dos AGE, tendo diminuído significativamente em t<sub>3</sub>. 18:2/T apresentou um teor mínimo em SH (8,8 %) seguido de ESt<sub>2</sub> (24 %), constituindo nos restantes tecidos 30 a 34 % dos AGE. 18:3/T apresentou também um mínimo em SH (5,5 %) não tendo porém, aumentado tão rapidamente na desdiferenciação como 18:2. Os *calli* são mais ricos em 18:3 que SHC e os ESt<sub>3</sub> apresentaram um teor máximo (32 %) correspondendo praticamente ao dobro do observado em ESt<sub>2</sub> (Tabela V.12). A variação relativa destes compostos espelha, aproximadamente, a variação observada para os AGL.

### *3.3 – Padrões de variação dos ácidos gordos esterificados (AGE)*

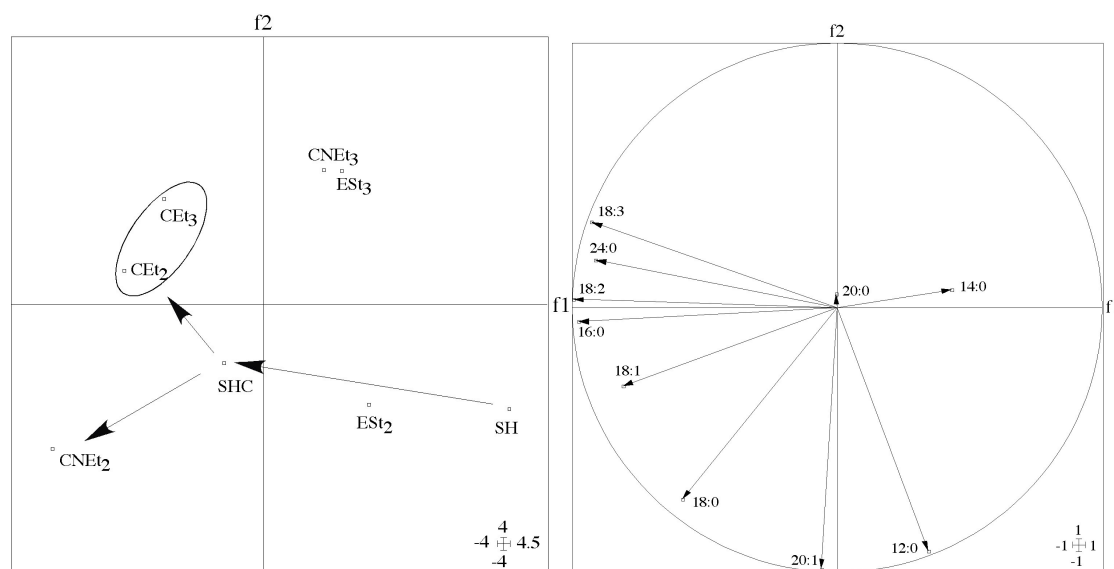
Tal como se procedeu para os ácidos gordos livres, realizaram-se análises multivariadas com os ácidos gordos esterificados. De um modo semelhante, usaram-se como variáveis dependentes quer os AGE individualmente, descritos na Tabela V.11, quer os somatórios e relações entre eles, descritos na Tabela V.12.

#### *3.3.1 – Análise de componentes principais dos AGE*

Não foram incluídos nesta análise os AGE 17:0, 22:0 e 22:1 devido ao reduzido número de amostras onde se detectaram esses compostos, nem os AGE 16:1 e 23:0 pelo facto das suas variações não ser estatisticamente significativa.

Embora os 2 primeiros factores (f1 e f2), extraídos da PCA, explicassem 75 % da inércia total, foi também seleccionado o 3º factor (f3) visto assim ficar explicada a quase totalidade da variabilidade (92 %). Tal como tinha sido observado para os AGL, a multicolinearidade com os AGE é globalmente baixa (Tabela V.13 - Apêndice C). O ácido palmítico está igualmente correlacionado positivamente com os ácidos linoleico e linolénico. Porém, ao contrário do observado com os AGL (Tabela V.9 - Apêndice C), 16:0 encontra-se correlacionado com 18:1 ( $r = 0,83$ ) e correlacionado positivamente com 24:0 e, este último, correlacionado também positivamente com 18:2 e 18:3. O AGE 20:1 está correlacionado positivamente com 12:0 (Tabela V.13 – Apêndice C). Não se encontraram correlações negativas significativas entre os AGE contrariamente ao ocorrido com os AGL. Esta observação é consistente com os pontos de vista de que a formação de ésteres neutros é, em termos metabólicos, um passo terminal que ocorre como resultado de um excesso de produção ou como de remoção de ácidos gordos não comuns no metabolismo celular, sendo de admitir que os ésteres constituem um reservatório de ácidos gordos. As relações negativas só podem ocorrer quando as sínteses/modificações dos ácidos gordos em questão não são reacções independentes, i.e., a síntese de um se faz à custa de outro, como acontece com os AGL. É mais difícil, no entanto, atribuir um significado biológico à correlação tão estreita ( $r > 0,85$ ) observada entre ésteres de ácidos gordos mais comuns (16:0, 18:2 e 18:3) e o éster do VLCFA 24:0, mas esta sugere que a formação de ésteres destes ácidos está, de certo modo, ligada.

As distribuições das variáveis independentes nos planos factoriais obtidos por combinações 2 a 2 dos factores escolhidos (f1, f2 e f3) estão representadas nas figuras V.27, V.29 e V.31, e os respectivos círculos de correlação, nas figuras V.28, V.30 e V.32.



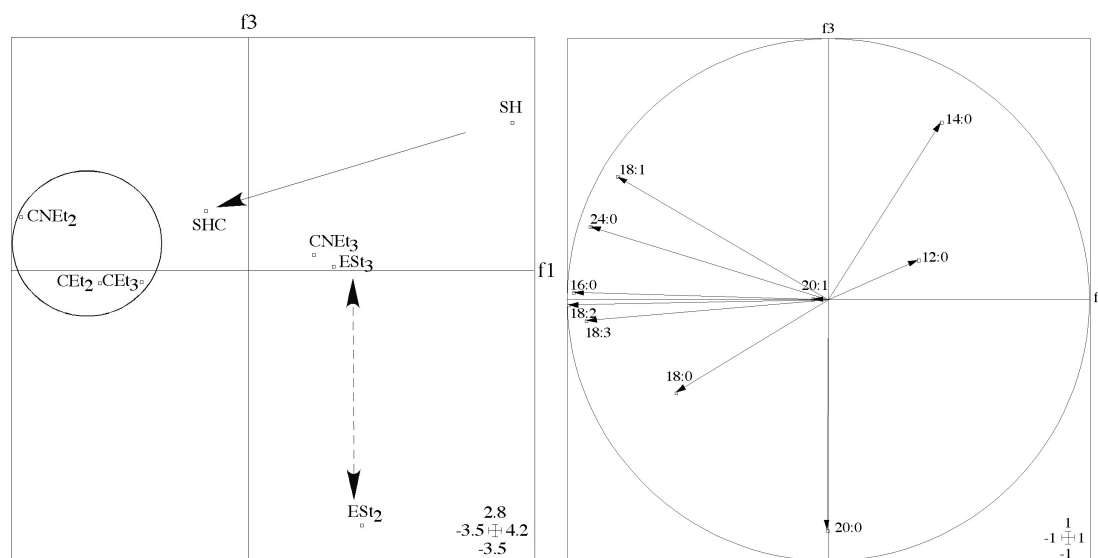
Figuras V.27 e V.28 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes (amostras) no mapa factorial f1-f2 obtido com PCA dos AGE; e respectivo círculo de correlações.

A distribuição das variáveis independentes, segundo o plano factorial definido pelos eixos f1 e f2 (fig. V.27), não revelou a existência de subconjuntos bem definidos como se tinha obtido com os AGL (fig. V.14). Praticamente todas as variáveis foram separadas, à excepção de CNEt<sub>3</sub> e ESt<sub>3</sub> e de CNEt<sub>2</sub> e CNEt<sub>3</sub> que formaram dois subconjuntos isolados. Este subconjunto formado pelos *calli* embrionários tinha sido igualmente definido pela PCA dos AGL (fig. V.14). Relativamente a esta análise, SHC destacou-se mais notoriamente de SH segundo o eixo f1, o que parece mostrar que as primeiras fases da desdiferenciação são de facto muito activas do ponto de vista da esterificação de ácidos gordos. Ao analisar o círculo de correlação das variáveis dependentes verifica-se que o eixo f1 foi definido por uma combinação linear dos AGE maioritários (16:0, 18:1, 18:2, 18:3) e de 24:0; e f2 definido por 12:0 e 20:1, todos com uma correlação negativa com os eixos respectivos (fig. V.28). Ao analisar os círculos de correlação de ambas as análises (figs. V.15 e V.28) constatou-se que na direcção de

desdiferenciação para indução e crescimento activo de *calli* (SH m SHC m *Calli* t<sub>2</sub>) houve, basicamente, um aumento do teor dos mesmos ácidos gordos (16:0, 18:2 e 18:3). Por outro lado, o teor de 24:0 na fracção de AGE aumentou enquanto que na fracção de AGL, o mesmo composto diminuiu. Os *calli* embriogénicos e CNEt<sub>2</sub> separaram-se também segundo f2. Embora não existam muitos mais ácidos gordos (AGL ou AGE) comuns a todos os tecidos para além dos principais, quando se comparam os dois círculos de correlação f1-f2 (figs. V.21 e V.28), verifica-se que também aqui, 20:1 foi um dos ácidos gordos que explicou a separação entre *calli* embriogénicos e CNEt<sub>2</sub>. Neste caso, para além deste composto, a segregação entre estes tipos de tecidos foi feita com base numa diminuição significativa de 12:0 nos *calli* embriogénicos (figs. V.27 e V.28). Os ESt<sub>2</sub> encontram-se separados dos ESt<sub>3</sub> e relativamente próximos de SH e SHC segundo este plano f1-f2 (fig. V.27), tal como foi observado com os AGL em plano equivalente (fig. V.14). No entanto, no caso dos AGE, a separação dos ES não foi feita com base em f1 (e portanto com base nos ácidos gordos principais), mas com base em f2. Dum modo geral e com base nos dados obtidos (Tabela V.11), esta ordenação das variáveis independentes era previsível. A separação entre SHC e SH, devido a um aumento dos AGE que definem f1; a localização de CNEt<sub>2</sub> e CE nos quadrantes (-)f1 (parte negativa do eixo f1) e de CNEt<sub>3</sub> em (+)f1, devido aos elevados teores daqueles compostos nas primeiras amostras e à sua diminuição em CNEt<sub>3</sub>. Um facto difícil de explicar é a separação de CNEt<sub>2</sub> dos restantes *calli* e a separação de ESt<sub>2</sub> de ESt<sub>3</sub> com base em f2, ou seja, perceber o papel dos AGE 12:0 e 20:1. SH, SHC, CNE em crescimento activo (t<sub>2</sub>) e ES jovens apresentaram teores elevados de 12:0 e de 20:1 esterificados, enquanto tecidos mais maduros (t<sub>3</sub>) apresentaram teores significativamente mais baixos. Pelos dados da Tabela V.7 verifica-se que o comportamento do ácido gordo 20:1, na forma livre, foi muito semelhante, acumulando-se preferencialmente nos explantes, em CNE em crescimento activo (t<sub>2</sub>) e nos ESt<sub>2</sub> e apresentando valores significativamente mais baixos em *calli* embriogénicos e ESt<sub>3</sub>.

O terceiro factor (f3), que explicou mais 17 % da variabilidade total foi definido por dois ácidos gordos de natureza semelhante aos que definiram f2. Um ácido gordo de cadeia mais curta – 14:0 – que está positivamente relacionado com o factor, e um VLCFA – 20:0 – o qual está correlacionado negativamente com o mesmo eixo (figs. V.28 e V.30). Este círculo de correlação mostra que estes AGE são praticamente as

únicas variáveis dependentes responsáveis pela geração da variável sintética f3. Estes compostos foram também os que definiram f3 da PCA dos AGL (figs. V.17 e V.19).



Figuras V.29 e V.30 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes no mapa factorial f1-f3 obtido com PCA dos AGE; e respectivo círculo de correlações.

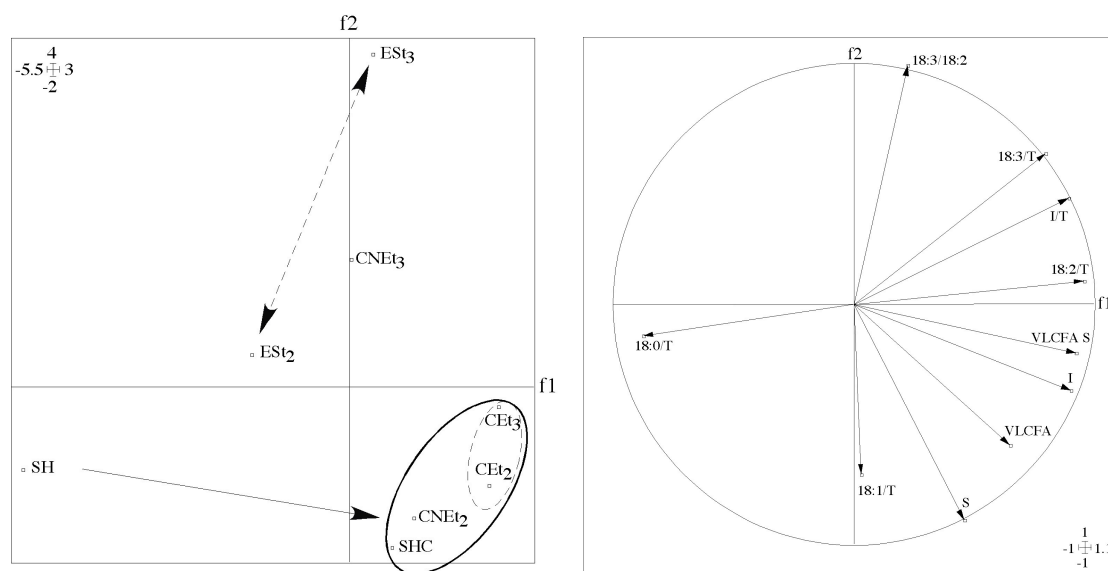
Quando se analisou a distribuição das amostras no plano f1-f3 (fig. V.29) verificou-se que SH, e principalmente ESt<sub>2</sub>, se destacavam do conjunto central (à volta do eixo f1 e perto da origem do eixo f3) em sentidos opostos deste eixo; SH no sentido positivo e ESt<sub>2</sub> no sentido negativo. Para além das diferenças encontradas com base em f1 (AGE principais) outra diferença relevante entre estes dois tipos de culturas, residuiu nos diferentes conteúdos de 14:0 e 20:0. Regressando à Tabela V.11 verifica-se que SH é, de facto, rico em ésteres de 14:0 não possuindo ésteres de 20:0 em quantidades detectáveis, e que ESt<sub>2</sub>, não possuindo 14:0, apresentou os teores máximos de 20:0. Comparando as Tabelas V.7 e V.11 verifica-se que CEt<sub>2</sub> e ESt<sub>2</sub> são também os tecidos mais ricos em 20:0 livre. ESt<sub>2</sub> também se separa de ESt<sub>3</sub> com base em f3. A distribuição no plano f2-f3 (fig. V.31) mostra o padrão esperado com base no anteriormente exposto, com os ESt<sub>2</sub> muito separados dos restantes tecidos, segundo f3, e f2 a separar as culturas das primeiras amostragens (t<sub>0</sub>, t<sub>1</sub> e t<sub>2</sub> à excepção de CEt<sub>2</sub>) das culturas amostradas em t<sub>3</sub>. Aparentemente, CEt<sub>2</sub> acumulam baixos teores de ésteres de 12:0 e 20:1 comparativamente a CNEt<sub>2</sub> e aos tecidos das primeiras amostragens (SH e SHC), acumulando porém, teores mais elevados de ésteres ricos em VLCFA (Tabela V.11).





encontradas com a análise dos AGL (Tabelas V.10 e V.14 do Apêndice C). Os dados permitem verificar que o grau de insaturação dos ésteres nos tecidos (**5**) está correlacionado positivamente com a proporção de 18:2 (**8**) e 18:3 (**9**) e negativamente com 18:0/T (**6**); VLCFA saturados (**4**) estão correlacionados positivamente com VLCFA totais (**3**); a proporção de 18:2 (**8**) está correlacionada positivamente com os AGE insaturados (**1**), negativamente com 18:0/T (**6**), mas, ao contrário do que foi observado com a fracção de AGL, está correlacionada ( $r = 0,83$ ) com a proporção de 18:3 (**9**). Isto pode ser explicado pelo facto de ambos os PUFAs poderem ser compostos constituintes do mesmo éster ou tipo de ésteres que são acumulados, enquanto que na forma livre podem estar mais ou menos representados num determinado tecido e num determinado momento. A explicação da correlação positiva entre os AGE insaturados (**1**) e VLCFA saturados (**4**) é menos directa. A falta de correlação entre 18:0/T e 18:3/T, que se tinha verificado nos AGL ( $r = -0,82$ , Tabela V.10 do Apêndice C) mostrou que a acumulação de ésteres com 18:0 ou com 18:3 foi relativamente independente.

Da análise do plano factorial f1-f2 verifica-se que o padrão de distribuição das variáveis independentes (fig. V.33) tem aspectos comuns ao padrão obtido com os parâmetros obtidos para os AGL (fig. V.20).



Figuras V.33 e V.34 (da esquerda para a direita) – Distribuição das variáveis independentes (amostras) no mapa factorial f1-f2 da PCA dos parâmetros obtidos a partir de AGE; e respectivo círculo de correlações.

Em síntese, verifica-se um grande afastamento de SHC relativamente a SH segundo f1; uma elevada proximidade entre os *calli* embriogénicos e; um elevado afastamento dos embriões somáticos segundo o eixo f2, estando os ESt<sub>2</sub> mais perto de SH que os ESt<sub>3</sub>, os quais se encontraram isolados de qualquer outro tecido (figs. V.20 e V.33). As variáveis dependentes que explicaram a formação dos eixos ou factores e deram origem a este mapa factorial, foram muito semelhantes às que originaram o mapeamento das variáveis dependentes análogas, obtidas a partir dos AGL (figs. V.20, V.21, V.33 e V.34). Com base neste conjunto de variáveis dependentes, não se conseguiu separar claramente os *calli* com base no seu tempo de cultura ou na sua capacidade embriogénica, sendo os CNet<sub>3</sub> os mais diferentes de todos (fig. V.33). Confrontando a figura V.34 e a Tabela V.12 verificou-se que a segregação de CNet<sub>3</sub> relativamente aos restantes *calli*, se deveu ao seu menor teor em S, I e VLCFA. Este facto sugere que, ao contrário do que se constatou com os AGL individuais, a embriogénese somática não é, do ponto de vista das alterações de AGE, um factor muito importante na estruturação dos dados, sendo a idade/qualidade dos embriões somáticos um factor mais determinante.

Com base na Tabela V.12 e no círculo de correlações (fig. V.34) podem tirar-se as seguintes conclusões: o isolamento de SH é devido a um baixo conteúdo de AGE em geral mas, também, a uma elevada proporção de 18:0; e a desdiferenciação e o crescimento activo de *callus* ocorreu em associação com uma acumulação de AGE, nomeadamente AGE insaturados, especialmente PUFAs, e VLCFA. Os CNet<sub>3</sub> isolaram-se essencialmente pelo baixo teor de AGE relativamente aos restantes *calli* (segundo f2 devido aos AGE saturados e segundo f1 devido aos insaturados). Os embriões mais maduros destacaram-se por terem apresentado a relação 18:3/18:2 mais elevada, um baixo teor de AGE saturados, quer em valor absoluto quer em valor relativo, e uma baixa proporção de 18:1. Os embriões mais jovens, apresentaram igualmente esta característica mas, tal com os explantes primários, uma elevada proporção de 18:0 e baixa de PUFAs. A distinção entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos com base nos AGE não foi, como se disse, muito evidente. Este facto deveu-se essencialmente ao peso excessivo da variação observada nos ácidos gordos de um modo geral (Tabela V.12). No entanto, com o auxílio das duas abordagens estatísticas (ANOVA e PCA), foi possível verificar que a distância entre CNet<sub>2</sub> e CEt<sub>2</sub> se explicou, essencialmente, pelos teores mais elevados de VLCFA saturados e VLCFA

totais nos C $\text{Et}_2$ , pelas proporções mais elevadas de 18:0 e 18:1 e proporções mais baixas de 18:3 nos C $\text{NEt}_2$ . Para além do aumento global de AGE nos *calli* em crescimento activo ( $t_2$ ), os *calli* com capacidade embriogénica parecem ter um metabolismo em AGE mais comprometido com a diferenciação morfogénica, acumulando mais ésteres ricos em 18:3 (ácido gordo principal das membranas tilacoidais) e em VLCFA (importantes na produção de componentes da cutícula).

## Discussão

### *1 – Variação ontogénica dos lípidos totais e respectivas fracções neutra e ácida*

Durante a germinação de sementes, as reservas acumuladas nos cotilédones, geralmente na forma de triglicerídeos (TAG), são mobilizadas via  $\beta$ -oxidação e ciclo do glioxilato nos glioxissomas (28). Esta mobilização foi observada tanto na germinação zigótica como na germinação de embriões somáticos a partir de cotilédones de *Panax ginseng in vitro* (25). No presente trabalho, a diminuição dos teores de lípidos totais, da fracção neutra e da fracção ácida, com a desdiferenciação dos segmentos sub-cotiledonares utilizados como explantes primários e subsequente desenvolvimento de *callus*, bem como a observação de teores significativamente mais elevados em ES que em *calli*, parece indicar não só que a composição química destes dois tipos de tecidos é diferente, mas também que compostos presentes nestas fracções são mobilizados para o crescimento celular dos *calli*. O facto de não ter havido alterações relevantes, nos teores destas fracções lipídicas (N e A), associadas à capacidade embriogénica dos *calli*, quer numa fase inicial da embriogénese somática ( $t_2$ ) quer numa fase mais avançada ( $t_3$ ), e desses teores serem muito mais elevados nos embriões somáticos que nos *calli* em  $t_2$ , parece sugerir maior actividade de biossíntese dos compostos destas fracções nos tecidos embrionários e não uma mobilização relevante de nutrientes a partir dos *calli* embriogénicos de que derivaram. Esta observação está de acordo com a teoria de que as células são autónomas no que respeita à biossíntese de glicerolípidos, não havendo portanto necessidade de um transporte relevante de ácidos gordos ou de glicerolípidos entre células (3). Contudo, quando se procuraram alterações mais subtis, nomeadamente no que respeita à razão fracção neutra/fracção ácida (fig. V.9) onde o valor registado para  $CEt_2$  foi significativamente inferior a  $CNEt_2$ , é possível prever que ocorram alterações no metabolismo lipídico associadas à indução e expressão da embriogénese somática. A diminuição significativa da fracção neutra, que se observou durante o desenvolvimento dos embriões somáticos (Tabela V.6) revelou que na indução de

embriões a partir de tecidos somáticos, ocorre primeiro uma fase de acumulação de compostos lipídicos nos ES em formação e depois a sua mobilização nas fases iniciais de desenvolvimento. Em *Arachis hypogea*, o teor em lípidos de reserva (TAG) também diminuiu durante o processo de desdiferenciação celular e aumentou com o desenvolvimento de embriões somáticos (24). Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies em cultura (22).

Decorrente do facto de haver consumo de lípidos de reserva nos embriões em cultura, tem-se questionado o papel da fonte de açúcar no meio de cultura e sua importância no desenvolvimento dos embriões relativamente às reservas lipídicas endógenas. Segundo alguns autores, a menor acumulação de lípidos de reserva nos embriões somáticos de linho relativamente aos embriões zigóticos é devida ao insuficiente suprimento de fonte de carbono no meio de cultura (14). No entanto, estudos sobre a germinação de embriões zigóticos e embriões somáticos de *Picea glauca in vitro* (44) mostraram que mesmo em presença de sacarose, e apesar desta ser necessária para uma germinação normal dos embriões, estes consumiram cerca de 72 % dos lípidos endógenos, revelando serem utilizadores obrigatórios de reservas lipídicas. Aparentemente a sacarose parece ser utilizada para sintetizar lípidos que são acumulados nos embriões jovens e não directamente num processo oxidativo para produção de energia e intermediários carbonados. Deste modo, e ao contrário do que acontece com *Panax ginseng* (25), o potencial embriogénico dos *calli* de linho (CE) parece não estar relacionado com a acumulação de componentes lipídicos nos mesmos. Uma hipótese que poderia explicar a ausência de diferenças entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos seria uma acumulação específica de compostos lipídicos apenas nas células embriogénicas, tal como se verificou em culturas de *Elaeis guineensis*, onde glóbulos lipídicos se acumularam nas células embriogénicas, antes dos embriões globulares se tornarem visíveis (20). No presente estudo, como na recolha das amostras os embriões visíveis foram destacados do *callus* de que derivaram, aquela diferença nunca seria detectada. A observação de que os *calli* embriogénicos apresentaram uma razão fracção neutra/fracção ácida significativamente inferior à dos *calli* não-embriogénicos em  $t_2$  (fig. V.9), leva a supôr que uma diferença na taxa de mobilização de constituintes lipídicos esterificados, com a concomitante libertação de ácidos gordos, possa ter ocorrido. É pois possível que apenas diferenças metabólicas mais subtis

possam explicar as diferentes capacidades embriogénicas apresentadas pelos dois tipos de *calli*, nomeadamente no balanço entre ácidos gordos livres e esterificados.

## 2 – Variação dos ácidos gordos livres e ácidos gordos esterificados

O linho é uma espécie cloroembriófita, ou seja, apresenta embriões zigóticos com cotilédones clorofilinos, contendo cloroplastos semelhantes aos das folhas. Embora estes embriões sejam capazes de realizar alguma actividade fotossintética, a baixa intensidade luminosa observada sob a testa (*ca.* de 15 % da intensidade externa) significa que a fotossíntese não contribuirá apreciavelmente para a produção de carbono na semente, mas que poderá ter um papel na contribuição de cofactores para a síntese de ácidos gordos (FAS) que se realiza mesmo a estas irradiâncias (43). Os *calli* obtidos neste sistema experimental do linho são também clorofilinos e consequentemente apresentam potencial fotossintético (47). Esta característica da espécie e do tipo de *calli* obtidos parecem assegurar a possibilidade de ocorrer actividade FAS neste tipo de culturas nas condições experimentais usadas. Sabe-se também que, embora o *callus* fotomixotrófico tenha capacidade para sintetizar lípidos, a sua incapacidade para existir como cultura fotoautotrófica independente reflecte mais uma falta de organização estrutural do que de potencial fotossintético (47). De facto evidências químicas obtidas neste sistema parecem corroborar esta ideia.

Os AGL são potentes detergentes, podendo, através desse efeito, destruir as membranas celulares. Acredita-se que exista, ou seja activado, um mecanismo celular responsável pela redução rápida dos níveis destes metabolitos quando aumentam nas células, para níveis de risco, em certas situações de stresse. Alguns exemplos são os casos da danificação de folhas (41, 42), de stresse osmótico em tecido foliar de *Brassica napus* (48) e de células em cultura tratadas com fungos elicítadores (42). A síntese de TAG, de modo a sequestrar os AGL produzidos pela hidrólise induzida pelo stresse, pode ser o mecanismo referido (48).

### 2.1 – Ácidos gordos principais ou mais comuns

Os ácidos gordos mais comuns são os de cadeia longa (LCFA) resultantes da actividade FAS e que vão fazer parte dos glicerolípidos estruturais. Estes são o 16:0 e o 18:0, com 1 a 3 ligações duplas *cis*.

A correlação entre a evolução dos organelos nos eucariotas e a emergência dos PUFA's sugere que estes ácidos gordos são componentes críticos das membranas celulares e dos organelos, principalmente como fosfolípidos (os lípidos principais dos organelos extracloroplastidiais), mas também como galactolípidos (lípidos principais das membranas dos cloroplastos). São compostos cruciais na regulação da arquitectura, da dinâmica, da transição de fase e da permeabilidade das membranas bem como no controlo dos processos celulares associados a membranas (49). Em muitas plantas superiores, 18:2 e 18:3 representam mais de 70 % dos ácidos gordos das células foliares e 55 a 70 % dos ácidos gordos totais em tecidos não fotossintéticos (50). Estes compostos encontram-se essencialmente esterificados na forma de glicerolípidos (42). Os glicolípidos (glicerolípidos glicosilados) são os lípidos mais abundantes nas folhas, estando localizados, principalmente, nas membranas tilacoidais dos cloroplastos. O ácido linolénico pode representar mais de 80 % da fracção acil (42) estando a sua síntese associada à maturação dos cloroplastos (51). Pensa-se que o aumento do teor deste ácido gordo, decorrente duma alteração no metabolismo lipídico do cloroplasto vs. citosol/RE possa traduzir uma evolução no sentido da fotoautotrofia (52). Células fotoautótrofas em cultura contêm lípidos mais ricos em 18:3 que células heterotróficas (52).

O enorme aumento dos teores de 18:2 e 18:3, livres e esterificados, com o início da desdiferenciação dos explantes primários e subsequente produção de *calli*, parece estar de acordo com uma elevada taxa de mobilização destes metabolitos para a biogénese de membranas durante o crescimento. A biossíntese de novas mitocôndrias e cloroplastos requer lípidos, para além de proteínas e ácidos nucleicos. *In vivo*, os cloroplastos tendem a produzir os lípidos de que necessitam, mas as mitocôndrias importam a maioria dos seus lípidos do retículo endoplasmático (53). A variação dos teores de 18:2 e 18:3 e da razão 18:3/18:2, corroborou a importância do ácido linolénico na composição dos tilacóides em tecidos verdes diferenciados (SH e ES), mas veio evidenciar também a importância específica do ácido linoleico em células com elevada

actividade mitótica, nomeadamente *calli* em  $t_2$ , uma fase de intenso crescimento (Tabelas V.7 e V.8 e figs. V.12 e V.13). Pensa-se que as elevadas exigências energéticas destas células e, portanto, biogénese intensa de membranas, nomeadamente de mitocôndrias, sejam responsáveis por uma maior exigência em 18:2, o PUFA mais abundante nas membranas extracloroplastideais (41), especialmente mitocondriais (40). Alguns autores constataram que a danificação de células levou a um aumento paralelo de 18:2 e 18:3 livres, quer nas próprias células danificadas quer em células saudáveis das folhas danificadas (42, 54). No nosso sistema, também se observou um aumento idêntico paralelo destes dois ácidos gordos logo nas fases iniciais da cultura coincidente com a indução e desenvolvimento de *callus* nos locais de corte dos explantes primários. Só depois se observou o aumento nos ácidos gordos saturados (Tabela V.7). Poder-se-á especular se o aumento selectivo destes ácidos gordos polinsaturados, por exemplo, por activação de fosfolipases (42, 54), não constituirá apenas um aspecto particular dum processo geral de indução de divisão celular, que pode ser para reparação de tecidos em resposta a um dano físico ou em resposta a um estímulo hormonal *in vitro*. O facto de a maior variação em ácidos gordos (livres ou esterificados) ser devido ao aumento destes ácidos gordos polinsaturados, sugere que o factor mais determinante na variação ontogénica dos AGL foi o catabolismo de lípidos de reserva, e que estes são maioritariamente constituídos por aqueles compostos. O padrão de variação ontogénica dos AGL polinsaturados - ambos aumentando com a desdiferenciação, mas apresentando máximos, 18:2 em *calli* e 18:3 em  $EST_3$  (Tabela V.8 ou fig. V.12) - leva ainda a supôr que o tipo de lípidos hidrolisados, utilizados como fonte de ácidos gordos, não será o mesmo nos diferentes tecidos.

Thies (55) notou que a acumulação de 18:3 ocorre apenas em sementes que possuem cloroplastos verdes e fotossinteticamente activos durante o seu desenvolvimento, tais como as Brassicaceae, Fabaceae e Linaceae. Este facto vem sustentar a hipótese dos  $EST_3$  poderem ser autotróficos ou mixotróficos e os  $EST_2$  terem um metabolismo mais heterotrófico. Esta hipótese advém da observação dos  $EST_3$  terem apresentado, especificamente, uma razão 18:3/18:2 e um teor de 18:3 livre significativamente mais elevados que  $EST_2$  (Tabelas V.7 e V.8 e figs. V.12 e V.13), bem como, uma sistemática separação de  $EST_2$  pelas PCAs realizadas, encontrando-se estes próximos dos SHC (figs. V.14 – V.19) ou dos *calli* (figs. V.20 e V.21). Globalmente, estes resultados poderão



significar que terão ocorrido alterações metabólicas associadas à mudança no modo de obtenção de carbono e energia dos embriões - dum modo mais heterotrófico em ESt<sub>2</sub>, mais dependente dos *calli* de que derivaram, a um modo mais autotrófico ou independente em ESt<sub>3</sub>. Existem outras evidências, nomeadamente as respeitantes ao perfil em *n*-alcanos, que irão ser discutidas ulteriormente, que também apoiam esta hipótese da ocorrência de uma alteração no modo de obtenção de carbono e energia dos embriões de t<sub>2</sub> para t<sub>3</sub>. Estes resultados sugerem ainda que a razão 18:3/18:2, após adequada calibração com métodos analíticos, poderá ser usada como marcador bioquímico da capacidade/viabilidade autotrófica das plântulas produzidas em condições *in vitro*.

Por outro lado, a variação na razão 18:0/18:3 nos diferentes tecidos, nomeadamente nos *calli* (fig. V.13), evidenciando diferenças estatisticamente tão robustas, bem como a separação de *calli* embriogénicos e não-embriogénicos obtida com a PCA de AGL (figs. V.14 – V.17), vieram mostrar que existem diferenças subtis ao nível do metabolismo dos ácidos gordos entre CE e CNE, permitindo especular sobre o papel da razão 18:0/18:3 como marcador bioquímico precoce da capacidade embriogénica de *callus*.

A ligação dupla *cis* no 18:1 induz, em princípio, um efeito de desordem nas membranas (56). O aumento de 18:1 livre ou esterificado nos *calli* em crescimento exponencial parece mostrar que o crescimento celular indiferenciado se encontra ligado a uma maior entropia das membranas plasmáticas. Por outro lado, a maior proporção de 18:0 e 18:1 na fracção éster e na fracção livre dos CNE, bem como os menores teores de VLCFA (totais ou saturados) esterificados, e de 18:2 e 18:3 livres, está de acordo com os resultados obtidos com CNE de *Prunus avium* (5) onde se constatou que uma elevada proporção de 16:0 (produto FAS) estaria relacionada com uma reduzida actividade de alongação de ácidos gordos (FAE) e da actividade das desaturases. Os mesmos autores sugeriram que as diferenças encontradas poderiam caracterizar uma falta de diferenciação dos CNE. Curiosamente, embora não se tenham verificado diferenças significativas no que diz respeito às quantidades de 16:0 e 24:0 livres entre CNE e CE de linho, a análise de componentes principais revelou que estes ácidos gordos se encontravam correlacionados negativamente (Tabela V.9 do Apêndice C).

## 2.2 – Ácidos gordos pouco comuns

Consideram-se ácidos gordos pouco comuns, por oposição aos ácidos gordos comuns, aqueles que não integram os lípidos estruturais. São exemplos, os ácidos gordos de cadeia curta (SCFA  $\leq 7$  C); de cadeia média ( $8 \leq$  MCFA  $\leq 14$  C) (26), ou de cadeia muito longa (VLCFA  $\geq 20$  C); os ácidos gordos de cadeia ímpar; os ácidos gordos mono- ou poli- hidroxilados entre outros. Estes compostos ocorrem principalmente em lípidos de reserva de sementes de certas espécies oleaginosas, sendo excluídos dos glicerolípidos polares e consequentemente das membranas (57).

### 2.2.1 – Ácidos gordos de cadeia ímpar e MCFA

A  $\alpha$ -oxidação dos ácidos gordos é um sistema catabólico em espiral que gera sucessivamente ácidos  $C_{n-1}$ . Contudo, parece não haver acumulação de intermediários, quer na oxidação  $\alpha$  ou  $\beta$ , visto os ácidos gordos de cadeia ímpar se encontrarem apenas em quantidades vestigiais nas folhas (16). De facto, os únicos ácidos gordos de cadeia ímpar detectados nas culturas de linho foram 17:0 e 23:0, nas formas livre e esterificada e 15:0, apenas na forma livre, podendo estes resultar da  $\alpha$ -oxidação directa dos ácidos gordos principais 16:0, 18:0 e 24:0. A presença de 15:0, 17:0, 17:1 e 17:3 foi detectada em sementes de linho em germinação, tendo-se assumido um envolvimento da  $\alpha$ -oxidação na sua biossíntese (59). Embora o significado da  $\alpha$ -oxidação de LCFA em folhas jovens não seja evidente (16), verificou-se que 17:0 se encontrava em níveis mais elevados nos embriões jovens de linho (ESt<sub>2</sub>), quer na forma livre quer na esterificada. O facto de 17:0, na forma esterificada, ter estado presente em níveis consideráveis ( $> 8$  mg/g lípidos totais) apenas em ESt<sub>2</sub>, parece mostrar que este composto, uma vez formado, foi sendo esterificado durante a acumulação. Estudos realizados indicaram que as células vegetais podem aumentar os níveis de AGL ou AGE ajustando o seu metabolismo de modo a degradar e/ou aumentar a síntese dos mesmos (59). Estando a  $\alpha$ -oxidação ligada à presença de  $H_2O_2$ , a hipótese destes embriões terem ainda um metabolismo fotossintético imaturo, em particular no que diz respeito à remoção de  $H_2O_2$ , não será de excluir. O facto de 15:0 ter apresentado níveis mínimos em ES de linho mais desenvolvidos (t<sub>3</sub>) parece apoiar esta hipótese. Este composto não se

acumulou na forma éster o que leva a concluir que também não se formará em quantidades apreciáveis.

Os ácidos gordos 12:0 e 14:0 são normalmente pouco abundantes. Várias famílias de plantas acumulam contudo grandes quantidades de MCFA, especialmente nas sementes (26). A biossíntese destes compostos não está ainda clarificada. Poderá eventualmente ser regulada pela actividade de tiosterases que hidrolisam especificamente acil-ACPs de cadeia média, tal como foi descrito para a síntese de 10:0 em sementes de *Cuphea lanceolata* (60) e de 12:0 em *Umbellaria californica* (61), ou ainda envolver o sistema de elongação de  $\alpha$ -cetoácidos (62). Evidências experimentais, utilizando plantas transformadas de *Brassica napus*, mostraram que a  $\beta$ -oxidação é o sistema responsável pela degradação de 12:0 produzido em tecidos não constituintes de sementes (57). No sistema *in vitro* do linho aqui discutido verificou-se que quantidades apreciáveis de 12:0 são também acumuladas na forma éster. Em SH, 12:0 foi o AGE mais representado (24 mg/g lípidos totais), enquanto que em ESt<sub>2</sub>, o respectivo teor era 5 vezes superior ao verificado em ESt<sub>3</sub>. Esta observação veio reforçar a ideia de que os embriões mais jovens estarão numa fase essencialmente acumuladora. Por outro lado, o valor significativamente inferior em CEt<sub>2</sub> relativamente a CNEt<sub>2</sub> e a não detecção deste tipo de ésteres em *calli* em t<sub>3</sub>, parece indicar que este composto terá algum papel no processo de diferenciação de ES e em tecidos indiferenciados em crescimento activo. Estudos feitos em *Brassica* transformada com UcFatB1 (gene da 12:0-ACP tioesterase) mostraram que 12:0 livre funciona como um sinal chave que estimula a indução da  $\beta$ -oxidação e diferenciação de peroxissomas (57). O ácido 14:0 ocorre em quantidades muito inferiores sendo também mais abundante em SH.

### 2.2.2 - VLCFA

A actividade de elongação dos ácidos gordos (FAE) e consequente formação de VLCFA saturados é parte integrante da biossíntese de ceras epicuticulares, realizada pelas células da epiderme das plantas. Esta actividade surge também durante a germinação de sementes devido à necessidade de impermeabilização dos tecidos aéreos recém-formados (62). Verificou-se, no entanto, que durante o processo de

desdiferenciação de segmentos de hipocótilo de linho em cultura, e embora na forma livre não tivesse ocorrido variação significativa de VLCFA, na forma éster, estes compostos aumentaram significativamente. Tendo-se mantido o nível com o crescimento de *calli*, o teor destes ésteres nos *calli* embriogénicos foi superior ao dos *calli* não-embriogénicos. A produção de ésteres de VLCFA associada à desdiferenciação de tecidos maduros não está bem esclarecida mas, os resultados levam a supôr que a acumulação de VLCFA saturados em SHC, provavelmente resultante de actividade FAE na epiderme dos hipocótilos, parece preceder qualquer indução embriogénica. O significado da maior acumulação de ésteres ricos em VLCFA em *calli* embriogénicos relativamente a *calli* não-embriogénicos, também não é conhecido. No entanto, os resultados indicam que estes compostos estarão envolvidos, de algum modo, na expressão embriogénica. Foi durante a indução de *callus* embriogénico a partir de cotilédones de *Cucumis melo* (39) que surgiram os ácidos gordos 20:0 e 22:0, tal como no linho (Tabela V.8). Em culturas de cenoura (*Daucus carota*), os embriões jovens (na fase globular) foram também os mais ricos em 20:0 (31), tal como os ESt<sub>2</sub> de linho. Existem ainda evidências que apontam para a produção de uma camada de natureza hidrofóbica à superfície de *calli* embriogénicos com funções, supostamente, de protecção destes tecidos (ref ver Kader 96 e Sterk et al. 91).

Na maior parte das espécies, as variações que ocorrem nos lípidos totais associadas à germinação, à capacidade embriogénica, ou ao desenvolvimento de plântulas são explicadas, geralmente, por variações nos TAG, lípidos com papel de reserva energética por excelência. Em culturas de *Brassica napus*, mesmo em *calli*, os TAG correspondem a 65 % dos lípidos (2). No conjunto dos ésteres podemos encontrar ácidos gordos ligados a glicerol (TAG, DAG, fosfolípidos) e ácidos gordos ligados a alcoóis alifáticos (ceras). Estes últimos podem também ser acumulados como lípidos de reserva de sementes, alternativamente aos TAG (64).

No que diz respeito aos teores de ácidos gordos obtidos por hidrólise de ésteres verificaram-se variações associadas, quer ao tempo em cultura das diferentes amostras, quer à capacidade embriogénica dos *calli* (Tabela V.11 e V.12). O desfasamento observado na acumulação dos ácidos gordos principais na forma livre e na forma esterificada (Tabelas V.7 e V.11), com a acumulação de ésteres a iniciar-se mais cedo, parece indicar que o aumento significativo dos AGL nos *calli* em t<sub>2</sub> se deveu, não só a

um aumento da síntese *de novo* (indicada pelo aumento do somatório 16:0+18:1 livres, que são, nas plantas superiores, os principais produtos FAS (34); ver Tabela V.8), mas também a uma disponibilização a partir da hidrólise dos ésteres acumulados anteriormente. As variáveis AGE totais (T), AGE insaturados (I) e saturados (S) foram significativamente superiores em CE quando comparados com CNE e ES em  $t_3$ , mas semelhantes em CE e CNE em  $t_2$ , o que leva a pensar que os *calli* não-embriogénicos poderão utilizar ésteres para o crescimento e/ou possa existir, nos *calli* embriogénicos, um balanço positivo na acumulação/síntese de ésteres de ácidos gordos principais. Em culturas de *Brassica napus*, verificou-se diminuição de reservas em *calli* durante o seu crescimento e aumento de fosfolípidos (2), o que, de certa maneira, apoia a primeira hipótese. Por outro lado, a segunda hipótese é apoiada por resultados descritos por outros autores, segundo os quais células com capacidade organogénica contêm maior quantidade de TAG (2). Na realidade nem todos os tipos de ésteres apresentam o mesmo comportamento. Trabalhos realizados em culturas de *calli* de *Brassica napus* (47) mostraram que a composição lipídica dos diferentes *calli* variava consoante o seu estado de diferenciação. Os *calli* fotomixotróficos caracterizaram-se pela capacidade de sintetizar maiores quantidades de TAG, MGDG e DGDG em contraste com os *calli* heterotróficos. O facto dos C $Et_3$  terem valores mais elevados de AGE que os CNE $t_3$ , designadamente 18:2 e 18:3, pode significar um maior potencial fotomixotrófico. No entanto, a falta de confirmação por outros indicadores químicos (nomeadamente uma razão 18:3/18:2 mais elevada) a suportar a hipótese de capacidade autotrófica, poderá revelar a já referida falta de organização supra-estrutural.

A estrutura/composição lipídica é uma característica bastante conservada no reino vegetal (6). Este facto é determinado essencialmente pela especificidade na estrutura/composição dos ácidos gordos de cada tipo membranar nas células vegetais. As propriedades físicas das membranas são largamente determinadas pelo comprimento da cadeia, polaridade e grau de insaturação dos ácidos gordos que constituem os seus lípidos (6), pelo que a distinção química dos tipos de membranas (com base nos grupos acil) estará na base das respectivas especificidades funcionais. Existem, contudo, diferenças relevantes entre sementes e folhas no que respeita ao metabolismo dos lípidos. Nas folhas, dado que a maior parte dos ácidos gordos são dirigidos para a produção de membranas, onde a composição em grupos acil é crítica para a sua

funcionalidade, as células parecem ter desenvolvido mecanismos de modo a prevenir a incorporação e/ou promover a remoção de ácidos gordos pouco comuns nas membranas. Nas sementes, pelo contrário, a incorporação de ácidos gordos nos lípidos de reserva parece estar sob um controlo menos apertado (57). Os ácidos gordos pouco comuns podem constituir mais de 90 % de toda a componente acil produzida pela semente, mas em quase todos os casos estes compostos estão presentes apenas nos TAG. O mecanismo exacto que explica a manutenção da composição dos glicerolípidos de membrana, com a exclusão/remoção daqueles ácidos gordos, e a maior variabilidade na composição dos glicerolípidos de reserva, não está ainda elucidado, mas pensa-se que envolverá tioesterases e enzimas FAS chave, com especificidades para determinados substratos (57). Estudos com espécies produtoras de ácidos gordos pouco comuns mostraram que estas apresentam geralmente fosfolipases específicas que os removem de lípidos polares e também uma série de acil-transferases e outras enzimas especializadas responsáveis pela sua metabolização (3). O facto de haver este controlo tão apertado, no tipo de ácidos gordos presentes nas células, leva a pensar que a hidrólise de certos ácidos gordos pouco comuns possa funcionar como sinal.

Em algumas espécies oleaginosas, incluindo *Arabidopsis* e *Brassica napus*, 18:1<sup>Δ9</sup>-CoA pode ser modificado por elongação e formar 20:1<sup>Δ11</sup>-CoA e 22:1<sup>Δ13</sup>-CoA no RE através da adição de dois fragmentos derivados do malonil-CoA produzido no citosol. Estes acil-CoAs podem fazer parte do “pool” citosólico de ácidos gordos esterificados a CoA, podendo ser transientemente incorporados na fosfatidilcolina (2) ou ser utilizados na síntese de TAG (3). Um processo análogo poderá ocorrer com os ésteres no presente sistema. Os componentes maioritários da fracção acil dos lípidos das sementes de linho são: os ácidos gordos 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 e 20:0 nos glicolípidos e, como componentes minoritários, 12:0, 16:1, 22:0 e 22:1 (98). O AGE 20:1, tal como o 12:0, acumulou-se essencialmente em SH, SHC, CNEt<sub>2</sub> (> CEt<sub>2</sub>) e ESt<sub>2</sub> (>> ESt<sub>3</sub>). O AGE 22:1 apresentou também valores mais altos em SH, SHC e ESt<sub>2</sub> (>> ESt<sub>3</sub>), mas ao contrário daqueles AGEs, a acumulação deste composto em CE foi muito mais elevada que em CNE. É curioso verificar que 22:1, mesmo em culturas de *Brassica napus* ricas neste composto (43), se encontra presente nos *calli* não-embriogénicos apenas em pequenas quantidades. Seria interessante investigar qual o significado da ligação entre a presença/ausência deste ácido gordo e a capacidade embriogénica de *calli*. Por outro

lado, analisando as diferenças encontradas entre  $EST_2$  e  $EST_3$  relativamente aos VLCFA monoinsaturados, uma importante questão que pode ser colocada é se as vias biossintéticas FAE estarão completamente activas nos embriões jovens. De facto, verificou-se haver acumulação de 20:0 e diminuição 18:1 em favor da acumulação de 20:1 e 22:1 nestes embriões, surgindo VLCFA saturados de cadeia mais longa (23:0 e 24:0) apenas mais tarde, em  $EST_3$  onde, paralelamente, ocorreu diminuição significativa de 20:0 e dos VLCFA monoinsaturados (Tabela V.11). Os resultados obtidos com a PCA de AGE, tendo separado claramente  $EST_2$  de  $EST_3$  com base em f2 e f3, ou seja, com base nos teores de 20:0 e 20:1, (figs. V.27 – V.31) evidenciaram a importância destes compostos na distinção fitoquímica de ES em fases de desenvolvimento diferente, provavelmente associada à eficiência do metabolismo FAE.

Tal como foi observado para outras espécies (2), os  $EST_2$  constituíram a amostra cujo perfil acil nos ésteres mais se assemelhou aos lípidos de reserva descrito para as sementes de linho. Este resultado parece mostrar que as reservas acumuladas nos embriões jovens germinados *in vitro*, a partir de *calli* embriogénico têm composição semelhante às acumuladas nas sementes.

Pouco se sabe sobre a regulação da produção de TAGs e da qualidade dos grupos acil em espécies com sementes ricas em linolenato, como o linho (65). Do mesmo modo, a formação e regulação de ésteres de *n*-alcanóis, também não está documentada. Estes tipos de lípidos, que podem integrar ácidos gordos pouco comuns e ser produzidos em células e tecidos somáticos, podem ser importantes do ponto de vista da produção *in vitro* de ácidos gordos de elevado interesse.

### *Conclusões e perspectivas*

Estratégias biotecnológicas eficazes, com o objectivo do melhoramento de oleaginosas no que diz respeito ao rendimento em óleo mas também à manipulação da sua composição acil, dependem não só do conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que controlam a biossíntese de lípidos de reserva nas sementes (2) mas, também, do alargamento desse conhecimento ao nível dos tecidos e células cultivadas *in vitro*. O estudo do sistema embriogénico e o padrão de acumulação de lípidos nos embriões somáticos dará uma informação valiosa nesse sentido (24).

A obtenção de plantas transgénicas abriu já um novo potencial naquela optimização, permitindo por um lado o estudo dos mecanismos reguladores e a função dos ácidos gordos, e por outro, abrindo a possibilidade de se introduzirem genes relevantes, existentes em espécies menos interessantes do ponto de vista agro-industrial, em espécies com maior interesse económico. Em transferências génicas com o objectivo da produção de lípidos de reserva de sementes que integrem determinados ácidos gordos específicos, poder-se-á utilizar virtualmente qualquer ácido gordo visto que, aparentemente, não há grandes constrangimentos funcionais na composição acil daquela classe de lípidos (11).

Este trabalho veio revelar que as culturas de linho também poderão dar um contributo nesta área de investigação. O facto das culturas de *calli* em fase de intenso crescimento acumularem ésteres de ácidos gordos economicamente relevantes, abre a possibilidade de se estudar uma adaptação à escala industrial para a produção desses metabolitos. Por exemplo, a produção de PUFAs tem interesse para a nutrição humana (66); 18:3 é ainda o precursor de EPA (*cis* 20:5), um ácido gordo de uso farmacêutico (67); 12:0, acumulado em elevados níveis nos *calli* não-embriogénicos, é também um importante recurso farmacológico (57, 61) e industrial (3), sendo tradicionalmente extraído dos óleos de coco e de palma para o fabrico de detergentes. De entre os VLCFA, que se acumulam mais especificamente nos *calli* embriogénicos, 22:1 é particularmente importante na produção de erucamida, um agente usado na indústria de filmes plásticos (3). Os ésteres de SCFA são importantes para a indústria dos lubrificantes e cosmética (3). A observação desta diversidade na composição acil nos constituintes lipídicos dos diferentes tipos de culturas de tecidos *in vitro*, poderá traduzir uma diversidade nas enzimas presentes ou activas. O estudo destes padrões enzimáticos nos diferentes tecidos será certamente relevante na perspectiva da manipulação genética da composição de ácidos gordos das espécies oleaginosas (7) e na exploração da regulação do metabolismo via introdução de cDNAs codificantes de enzimas modificadas da biossíntese de lípidos (2).

Presentemente os PUFAs são obtidos comercialmente a partir de espécies seleccionadas. O ácido linolénico é obtido de *Linum* spp (4 - 21 % peso fresco) e, alternativamente, de *Chlorella* spp (0,9 - 1,7 %) (49). Tem-se contudo tornado evidente, que a produção a partir dos recursos tradicionais se está a tornar inadequada para



responder ao mercado em expansão, quer em termos de qualidade quer em termos de quantidade (49). A deficiente oferta advém fundamentalmente de desvantagens intrínsecas das culturas no campo, tais como as variações sazonais e climáticas e baixa produtividade económica. Torna-se necessário, portanto, a procura de fontes alternativas, sendo a engenharia genética e o uso de organismos inferiores uma das vias (49). Uma outra solução alternativa seria o uso de culturas de tecidos ou de células ricas em determinados ácidos gordos que, por um lado, colmatam as desvantagens das espécies cultivadas, do tempo e da heterogeneidade do material e, por outro, constitui uma solução com menor impacto social quando comparada com o uso de plantas transgénicas. Por outro lado, a manipulação do meio, no que diz respeito à fonte de carbono (20) e reguladores de crescimento utilizados (33, 34) poderá ainda alargar a possibilidade de manipulação dos ácidos gordos pretendidos.

# Discussão

## *1 – Variação ontogénica a fracção de lípidos totais*

Durante a germinação de sementes, as reservas, geralmente na forma de triglicerídeos (TAG), acumuladas nos cotilédones são mobilizadas via  $\beta$ -oxidação e ciclo do glioxilato nos glioxissomas (107). Esta mobilização foi observada tanto na germinação zigótica como na germinação de embriões somáticos a partir de cotilédones de *Panax ginseng in vitro* (62). No presente trabalho, a diminuição observada no teor lipídico com a desdiferenciação do explante primário e consequente produção de *calli* foi acompanhada por uma redução proporcional de ambas as fracções lipídicas – neutra e ácida – o que mostra que os tecidos são diferentes no que respeita aos teores lipídicos específicos, os quais terão sido foram mobilizados para o crescimento celular. Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas com o tempo, quer em *calli* quer nos embriões somáticos, no que diz respeito ao teor lipídico total, a fracção neutra diminuiu significativamente com o crescimento dos embriões, revelando que na indução de embriões a partir de tecidos somáticos, ocorre primeiro uma fase de acumulação de reservas e depois uma mobilização das mesmas para suportar o desenvolvimento heterotrófico dos embriões somáticos mantidos *in vitro*. Em *Arachis hypogea*, o teor em lípidos de reserva (TAG) também diminuiu durante o processo de desdiferenciação celular e aumentou com o desenvolvimento de embriões somáticos (103=40). Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies em cultura (41).

Uma questão decorrente do facto de haver consumo de lípidos de reserva nos embriões em cultura, é sobre o papel da fonte de açúcar no meio de cultura e sua importância no desenvolvimento dos embriões relativamente às reservas lipídicas endógenas. Foi discutido que a menor acumulação de lípidos de reserva nos embriões somáticos de linho relativamente aos embriões zigóticos foi devida a uma insuficiente fonte de carbono no meio de cultura (102). No entanto, estudos sobre a germinação de embriões zigóticos e somáticos de *Picea glauca in vitro* (106) mostraram que mesmo na presença da sacarose, e apesar desta ser necessária para uma germinação normal dos embriões, estes consumiram cerca de 72 % dos lípidos endógenos, revelando serem utilizadores obrigatórios de reservas

lipídicas. Aparentemente a sacarose parece ser utilizada para sintetizar lípidos que são acumulados nos embriões jovens e não directamente num processo oxidativo para produção de energia e intermediários carbonados. Ao contrário do trabalho acima referido (62), onde se verificou que a percentagem de indução de embriões diminuía com a redução de reservas nos cotilédones, neste modelo experimental não se encontraram diferenças significativas entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos relativamente ao teor lipídico total ou ao teor em lípidos neutros. Deste modo, não parece que a acumulação de reservas nos *calli* embriogénicos de linho possa estar relacionada com um potencial embriogénico predeterminado dos mesmos, como avançado para o caso da germinação em *Panax ginseng* (62). Uma hipótese que poderia explicar a ausência de diferenças entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos seria uma acumulação específica de reservas apenas nas células embriogénicas, tal como se verificou em culturas de *Elaeis guineensis*, onde glóbulos lipídicos se acumularam nas células embriogénicas, antes dos embriões globulares se tornarem visíveis (ref., 61). No presente estudo, como na recolha das amostras os embriões visíveis foram destacados do *callus* de que derivaram, aquela diferença nunca seria detectada. A observação de que os *calli* embriogénicos apresentaram uma razão fracção neutra/fracção ácida significativamente inferior à dos *calli* não-embriogénicos em  $t_2$  (fig. 9), leva a supôr que uma diferença na taxa de mobilização das reservas, com a concomitante libertação de ácidos gordos, possa ter ocorrido. Um elevado nível de fosfolípidos em *calli* embriogénicos foi associado a uma elevada actividade celular durante a embriogénese somática (ref., 61). Foi descrito que a indução de lipoxigenases específicas (oxido-reductase do linoleato ou LOX) está implicada na mobilização de reservas durante a germinação de plantas oleaginosas (89) e que os níveis de LOX presentes em cada tecido podem variar marcadamente entre diferentes órgãos e entre diferentes fases de desenvolvimento dum tecido em particular (48). É possível que a indução de uma LOX e a consequente formação de certos ácidos em *calli* embriogénico sirvam de sinal para a degradação de reservas e torne as células comprometidas com a germinação, ou neste caso, com a via embriogénica. As LOXs das plantas são enzimas extremamente activas (58) e actuam nos ácidos gordos esterificados, catalisando a adição de  $O_2$  a ácidos com sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno tal como o 18:2 e o 18:3, gerando os hidroperóxidos insaturados correspondentes. Não se encontraram contudo hidroperóxidos ou sequer diferenças significativas nos ácidos gordos polinsaturados livres mencionados entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos. É possível que apenas diferenças químicas

mais subtis possam explicar as diferentes capacidades embriogénicas apresentadas pelos dois tipos de *calli*.

### *1.1 – Variação dos ácidos gordos livres*

O linho é uma espécie cloroembriófita, ou seja, apresenta embriões zigóticos com cotilédones clorofilinos, contendo cloroplastos semelhantes aos das folhas. Embora estes embriões sejam capazes de realizar alguma actividade fotossintética, a baixa intensidade luminosa observada dentro da cápsula (*ca.* de 15 % da intensidade externa) significa que a fotossíntese não contribuirá apreciavelmente para a produção de carbono na semente, mas que poderá ter um papel na contribuição de co-factores para a síntese de ácidos gordos (FAS) que se realiza mesmo a estas irradiâncias (34). Os *calli* obtidos neste sistema experimental do linho são também clorofilinos e consequentemente apresentam potencial fotossintético (71). Esta característica da espécie e do tipo de *calli* obtidos parecem assegurar a possibilidade de ocorrer actividade FAS neste tipo de culturas nas condições experimentais usadas. Sabe-se também que embora o *callus* fotomixotrófico tenha capacidade para sintetizar lípidos, a sua incapacidade para existir como cultura fotoautotrófica independente, reflecte mais uma falta de organização estrutural do que de potencial fotossintético (71). De facto evidências químicas obtidas neste sistema parecem corroborar esta ideia.

Os AGL são potentes detergentes, podendo, através desse efeito, destruir as membranas celulares. Acredita-se que exista, ou seja activado, um mecanismo celular responsável pela redução rápida dos níveis destes metabolitos quando aumentam nas células, para níveis de risco, em certas situações de stresse. Alguns exemplos são os casos da danificação de folhas (63, 64), de stresse osmótico em tecido foliar de *Brassica napus* (15) e de células em cultura tratadas com fungos elicitadores (64). A síntese de TAG, de modo a sequestrar os AGL produzidos pela hidrólise induzida pelo stresse, pode ser o mecanismo referido (15).

#### *1.1.1 – Ácidos gordos principais ou mais comuns*

Os ácidos gordos mais comuns são os de cadeia longa (LCFA) resultantes da actividade FAS e que vão fazer parte dos glicerolípidos estruturais. Estes são o 16:0 e o 18:0, este com 1 a 3 ligações duplas *cis*.

A correlação entre a evolução dos organelos nos eucariotas e a emergência dos PUFA's sugere que estes ácidos gordos são componentes críticos das membranas celulares e dos organelos, principalmente como fosfolípidos (os lípidos principais dos organelos extracloroplastidiais), mas também como galactolípidos (lípidos principais das membranas dos cloroplastos). São compostos cruciais na regulação da arquitetura, da dinâmica, da transição de fase e da permeabilidade das membranas bem como no controlo dos processos celulares associados a membranas (39). Em muitas plantas superiores, 18:2 e 18:3 representam mais de 70 % dos ácidos gordos das células foliares e 55 a 70 % dos ácidos gordos totais em tecidos não fotossintéticos (ref. 70). Estes compostos encontram-se essencialmente esterificados na forma de glicerolípidos (64). Os glicolípidos (glicerolípidos glicosilados) são os lípidos mais abundantes nas folhas, estando localizados, principalmente, nas membranas tilacoidais dos cloroplastos. O ácido linolénico pode representar mais de 80 % da fracção acil (64) estando a sua síntese associada à maturação dos cloroplastos (ref., 66). Pensa-se que o aumento do teor deste ácido gordo, decorrente duma alteração no metabolismo lipídico do cloroplasto vs. citosol/RE possa traduzir uma evolução no sentido da fotoautotrofia (60). Células fotoautótrofas em cultura contêm lípidos mais ricos em 18:3 que células heterotróficas (60).

O enorme aumento de 18:2 e 18:3 com o início da desdiferenciação dos explantes e produção de *calli*, quer na forma livre quer na forma esterificada, parece estar de acordo com uma elevada taxa de mobilização destes metabolitos para a biogénese de membranas durante o crescimento. A biossíntese de novas mitocôndrias e cloroplastos requer lípidos, para além de proteínas e ácidos nucleicos. *In vivo*, os cloroplastos tendem a produzir os lípidos de que necessitam, mas as mitocôndrias importam a maioria dos seus lípidos do retículo endoplasmático (Energy conversion: mitochondrion and chloroplasts. (1994) In: Molecular Biology of the Cell. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. Watson (Eds) 3<sup>rd</sup> edition, Garland publishing, inc. New York, pp 653-720). A variação relativa de 18:2 e 18:3 corroborou a importância do ácido linolénico na composição dos tilacóides, mas veio evidenciar também a importância específica do ácido linoleico em células com elevada actividade mitótica, nomeadamente *calli* em  $t_2$ . Pensa-se que as elevadas exigências energéticas destas células, e portanto biogénese intensa de membranas, nomeadamente de mitocôndrias, sejam responsáveis por uma maior exigência em 18:2, o PUFA mais abundante nas membranas extracloroplastideais (63) especialmente demitocôndriais (ref. Harwood 1987). Constatou-se que a danificação de células levou a

um aumento paralelo de 18:2 e 18:3 livres, quer nas células danificadas quer em células saudáveis de folhas danificadas (64, 65). Poder-se-á especular se o aumento selectivo destes ácidos gordos polinsaturados, por activação de fosfolipases em resposta ao dano, constitui um aspecto particular dum processo mais global de estimulação à reparação dos tecidos traduzido na indução da divisão celular. No nosso sistema, também se observou um aumento idêntico paralelo destes dois ácidos gordos logo nas fases iniciais da cultura coincidente com a indução e diferenciação de *callus* nos locais e corte dos explantes primários. Só depois se observou um aumento nos ácidos gordos saturados (Tabela 7).

Thies (1970) notou que a acumulação de 18:3 ocorre apenas em sementes que possuem cloroplastos verdes e fotossinteticamente activos durante o seu desenvolvimento, tais como as Brassicaceae, Fabaceae e Linaceae. Este facto vem sustentar as hipóteses dos ESt<sub>3</sub> poderem ser autotróficos ou mixotróficos (elevado teor de 18:3 livre) e da razão 18:3/18:2 poder ser um marcador bioquímico da capacidade fotoautotrófica de plântulas crescidas em condições *in vitro*, visto ser significativamente maior que nas restantes amostras mas, principalmente, maior que nos ESt<sub>2</sub>.

A ligação dupla *cis* no 18:1 induz, em princípio, um efeito de desordem nas membranas (111). O aumento de 18:1 livre ou esterificado nos *calli* em crescimento exponencial parece mostrar que o crescimento celular indiferenciado se encontra ligado a uma maior entropia das membranas plasmáticas. Por outro lado, a maior proporção de 18:0 e 18:1 na fracção éster e na fracção livre dos CNE, o menor teor de VLCFA (totais ou saturados) nos ésteres, bem como o menor teor de 18:2 e 18:3 livres, está de acordo com os resultados obtidos com *Prunus avium* (26) onde se mostrou que, uma elevada proporção de 16:0 (produto FAS) nos CNE estaria relacionada com uma reduzida actividade de alongação de ácidos gordos (FAE) e da actividade das desaturases. Os mesmos autores sugeriram que as diferenças encontradas poderiam caracterizar uma falta de diferenciação dos CNE. Curiosamente, embora não se tenham verificado diferenças significativas no que diz respeito às quantidades de 16:0 e 24:0 livres entre CNE e CE, a análise de componentes principais revelou que estes ácidos gordos se encontravam correlacionados negativamente (Tabela 9).

A acumulação diferencial de ácidos gordos saturados e insaturados nos explantes relativamente aos restantes tecidos, traduzida num elevado teor de saturados (especialmente 16:0 e 18:0) nos primeiros, pode ser explicado pelo facto destes ácidos

gordos serem sintetizados antes de serem incorporados nos glicerolípidos, contrariamente a os polinsaturados que são formados nos glicerolípidos. Outra razão prende-se com diferenças na estabilidade dos ácidos gordos, sendo os polinsaturados livres muito menos estáveis, sujeitos a oxidação por radicais livres por via enzimática ou não (64).

### *1.1.2 – Ácidos gordos pouco comuns*

Consideram-se ácidos gordos pouco comuns, por oposição aos ácidos gordos comuns, aqueles que não integram os lípidos estruturais. São exemplos, os ácidos gordos de cadeia curta (SCFA  $\leq 7$  C); de cadeia média ( $8 \leq$  MCFA  $\leq 14$  C) (3), ou de cadeia muito longa (VLCFA  $\geq 20$  C); os ácidos gordos de cadeia ímpar; os ácidos gordos mono- ou polihidroxilados entre outros. Estes compostos ocorrem principalmente em lípidos de reserva de sementes de certas espécies oleaginosas, sendo excluídos dos glicerolípidos polares e consequentemente das membranas (80).

#### *1.1.2.1 – Ácidos gordos de cadeia ímpar e MCFA*

A  $\alpha$ -oxidação dos ácidos gordos é um sistema catabólico em espiral que gera sucessivamente ácidos  $C_{n-1}$ . Contudo parece não haver acumulação de intermediários, quer na oxidação  $\alpha$  ou  $\beta$ , visto os ácidos de cadeia ímpar se encontrarem apenas em quantidades vestigiais nas folhas (47). De facto, foram encontrados poucos ácidos gordos de cadeia ímpar nos tecidos amostrados, apenas 15:0, 17:0 e 23:0, podendo estes resultar da  $\alpha$ -oxidação directa dos ácidos gordos principais 16:0 e 18:0 e do VLCFA 24:0. A presença de 15:0, 17:0, 17:1 e 17:3 foi detectada em sementes de linho em germinação, tendo-se assumido um envolvimento da  $\alpha$ -oxidação na respectiva biossíntese (ref., 47). Embora o significado da  $\alpha$ -oxidação de LCFA em folhas jovens não seja evidente (47), verificou-se que 17:0 se encontrava em níveis mais elevados nos embriões jovens de linho (ESt<sub>2</sub>), quer na forma livre quer na esterificada. O facto de 17:0, na forma esterificada, ter estado presente em níveis consideráveis ( $> 8$  mg/g lípidos totais) apenas em ESt<sub>2</sub>, parece mostrar que este composto foi removido durante a acumulação. Estudos realizados indicaram que as células vegetais podem aumentar os níveis de AGL ou AGE ajustando o seu metabolismo de modo a degradar e/ou aumentar a síntese dos mesmos (93). Estando a  $\alpha$ -oxidação ligada à presença de  $H_2O_2$ , a hipótese destes embriões terem ainda um metabolismo fotossintético imaturo, em particular no que diz respeito à remoção de  $H_2O_2$ ,

não será de excluir. O facto de 15:0 ter apresentado níveis mínimos em ES de linho mais desenvolvidos ( $t_3$ ) parece apoiar esta hipótese. Este composto não se acumulou na forma éster o que leva a concluir que não se formará em quantidades apreciáveis.

Os ácidos gordos 12:0 e 14:0 são normalmente pouco abundantes, tendo sido observados nas amostras de linho. Várias famílias de plantas acumulam contudo grandes quantidades de MCFA nos lípidos das suas sementes (3). A biossíntese destes compostos não está ainda clarificada. Poderá eventualmente ser regulada pela actividade de tiosterases que hidrolisam especificamente acil-ACPs de cadeia média, tal como foi descrito para a síntese de 10:0 em sementes de *Cuphea lanceolata* (73) e de 12:0 em *Umbellaria californica* (ref.), ou ainda envolver o sistema de alongação de  $\alpha$ -cetoácidos (76). Evidências experimentais, utilizando plantas transformadas de *Brassica napus*, mostraram que a  $\beta$ -oxidação é o sistema responsável pela degradação de 12:0 produzido em tecidos não constituintes de sementes (80). No sistema *in vitro* do linho aqui discutido verificou-se que quantidades apreciáveis de 12:0 são também acumuladas na forma éster. Em SH, 12:0 foi o AGE mais representado (24 mg/g lípidos totais), enquanto que em ESt<sub>2</sub>, o respectivo teor era 5x superior ao verificado em ESt<sub>3</sub>. Esta observação veio reforçar a ideia de que os embriões mais jovens estão numa fase essencialmente acumuladora. Por outro lado, o valor significativamente inferior em CEt<sub>2</sub> relativamente a CNEt<sub>2</sub> e a não detecção deste tipo de ésteres em *calli* em  $t_3$ , parece indicar que este composto terá um papel importante como fonte de carbono e energia em tecidos em crescimento activo. Estudos feitos em *Brassica* transformada com UcFatB1 (gene da tiosterase do 12:0-ACP) mostraram que 12:0 livre funciona como um sinal chave que estimula a indução da  $\beta$ -oxidação e diferenciação de peroxissomas (80). O ácido 14:0 ocorre em quantidades muito inferiores sendo também mais abundante em SH.

#### 1.1.2.2 - VLCFA

A actividade de alongação dos ácidos gordos (FAE) (formação de VLCFA saturados) é parte integrante da biossíntese de ceras epicuticulares, a qual é a principal função da epiderme das plantas. Esta actividade surge também durante a germinação de sementes devido à necessidade de impermeabilização dos tecidos aéreos recém-formados (75). Verificou-se no entanto que, durante o processo de desdiferenciação de segmentos de hipocótilo de linho em cultura, e embora na forma livre não tivesse ocorrido variação



significativa de VLCFA, na forma éster os mesmos aumentaram significativamente. Tendo-se mantido o nível com a produção de *calli*, o teor destes ésteres nos *calli* embriogénicos foi superior ao dos *calli* não-embriogénicos. Estes resultados levam a supôr que a acumulação de VLCFA saturados nos tecidos em diferenciação, provavelmente resultante de actividade FAE na epiderme dos hipocótilos, parece preceder qualquer indução embriogénica. Por outro lado, o facto dos *calli* embriogénicos apresentarem teores de VLCFA mais elevados que os não-embriogénicos parece indicar que, de algum modo, estes compostos estarão envolvidos na expressão embriogénica. Foi durante a indução de *callus* embriogénico a partir de cotilédones de *Cucumis melo* (31) que surgiram os ácidos gordos 20:0 e 22:0 tal como no linho (Tabela 8). Em culturas de cenoura (*Daucus carota*), os embriões jovens (na fase globular) foram também os mais ricos em 20:0 (66) tal como os ESt<sub>2</sub> de linho.

### 1.2 – Variação dos ácidos gordos esterificados

Na maior parte das espécies, as variações que ocorrem nos lípidos totais associadas à germinação, à capacidade embriogénica ou ao desenvolvimento de plântulas são explicadas, geralmente, por variações nos TAG, lípidos com papel de reserva energética por excelência. Em culturas de *Brassica napus*, mesmo em *calli*, os TAG correspondem a 65 % dos lípidos (114). Como já foi referido, não se verificaram diferenças significativas, quer nos lípidos totais quer na fracção neutra, entre *calli* embriogénicos e não-embriogénicos. No conjunto dos ésteres podemos encontrar ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol (TAG e DAG) e ácidos ligados a alcoóis alifáticos (ceras). Estes últimos podem também ser acumulados como lípidos de reserva de sementes, alternativamente aos TAG (45). Ao contrário destes, que formando grandes massas hidrofóbicas existem essencialmente em ambiente anidro (113), os ésteres de alcoóis alifáticos podem ter eventualmente um papel importante em células e tecidos em cultura.

No que diz respeito aos teores de ácidos gordos obtidos por hidrólise de ésteres verificaram-se variações associadas quer à capacidade embriogénica dos *calli*, quer ao tempo em cultura das diferentes amostras (Tabela 11 e 12). Os parâmetros AGE totais (T), AGE insaturados (I) e saturados (S) foram significativamente superiores em CE quando comparados com CNE e ES em t<sub>3</sub>, mas semelhantes em CE e CNE em t<sub>2</sub>, o que leva a pensar que ou os *calli* não-embriogénicos utilizam ésteres para crescimento e/ou os *calli*

embrionários mantêm um balanço positivo na acumulação/síntese de ésteres de ácidos gordos principais. Em culturas de *Brassica napus*, verificou-se diminuição de reservas em *calli* durante o seu crescimento e aumento de fosfolípidos (114), o que apoia de certa maneira a primeira hipótese. Por outro lado, encontra-se também descrito que células com capacidade organogénica contêm maior quantidade de TAG (114), o que apoia a segunda. Na realidade nem todos os tipos de ésteres apresentam o mesmo comportamento. Trabalhos realizados em culturas de *calli* de *Brassica napus* (71) mostraram que a composição lipídica dos diferentes *calli* variava consoante o seu estado de diferenciação. Os *calli* fotomixotróficos caracterizaram-se pela capacidade de sintetizar maiores quantidades de TAG, MGDG e DGDG em contraste com os *calli* heterotróficos. O facto dos C<sub>ET</sub> terem valores mais elevados de AGE que os C<sub>NET</sub> pode significar um maior potencial fotomixotrófico, no entanto, a falta de confirmação por outros indicadores químicos (nomeadamente uma razão 18:3/18:2 mais elevada) a suportar a hipótese de capacidade autotrófica, poderá indicar a já referida falta de organização supraestrutural.

A estrutura/composição lipídica é uma característica bastante conservada no reino vegetal (72). Este facto é determinado essencialmente pela especificidade na estrutura/composição dos ácidos gordos de cada tipo membranar nas células vegetais. As propriedades físicas das membranas são largamente determinadas pelo comprimento da cadeia, polaridade e grau de insaturação dos ácidos gordos que constituem os seus lípidos (72), pelo que a distinção química dos tipos de membranas (com base nos grupos acil) estará na base das respectivas especificidades funcionais. Existem contudo diferenças relevantes entre sementes e folhas no que respeita ao metabolismo dos lípidos. Nas folhas, como a maior parte dos ácidos gordos são dirigidos para a produção de membranas, onde a composição em grupos acil é crítica para a sua funcionalidade, as células parecem ter desenvolvido mecanismos de modo a prevenir a incorporação e/ou de promover a excisão de ácidos gordos pouco comuns nas membranas. Nas sementes, pelo contrário, a incorporação de ácidos gordos nos lípidos de reserva parece estar sob um controlo menos apertado (80). Os ácidos gordos pouco comuns podem constituir mais de 90 % de toda a componente acil produzida pela semente, mas em quase todos os casos estes compostos estão presentes apenas nos TAG. Sabe-se ainda que muitos destes compostos são integrados na fosfatidilcolina (PC), um dos principais fosfolípidos de membrana (113). O mecanismo exacto que explica a manutenção da composição dos glicerolípidos de membrana, com a exclusão/remoção daqueles ácidos gordos, e a maior variabilidade na composição dos glicerolípidos de reserva, não está ainda

elucidado mas pensa-se que envolverá tiosterases e enzimas FAS chave, com especificidades para determinados substratos (80). Estudos com espécies produtoras de ácidos gordos pouco comuns mostraram que estas apresentam geralmente fosfolipases específicas que os removem de lípidos polares e também uma série de aciltransferases e outras enzimas especializadas responsáveis pela sua metabolização (113). O facto de haver este controlo tão apertado no tipo de ácidos gordos presentes nas células leva a pensar que a hidrólise de certos ácidos gordos pouco comuns possa funcionar como sinal.

Em algumas espécies oleaginosas, incluindo *Arabidopsis* e *Brassica napus*, 18:1<sup>Δ9</sup>-CoA pode ser modificado por elongação e formar 20:1<sup>Δ11</sup>-CoA e 22:1<sup>Δ13</sup>-CoA no RE através da adição de dois fragmentos derivados do malonil-CoA produzido no citosol. Estes acil-CoAs podem fazer parte do “pool” citosólico de ácidos gordos esterificados a CoA, podendo ser transientemente incorporados na PC (114) ou ser utilizados na síntese de TAG (113). Um processo análogo poderá ocorrer com os ésteres no presente sistema. Os componentes principais da fracção acil total dos lípidos das sementes de linho são os ácidos gordos 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 e 20:0 nos glicolípidos e, como componentes minoritários, 12:0, 16:1, 22:0 e 22:1 (98). O AGE 20:1, tal como o 12:0, acumulou-se essencialmente em SH, SHC, CNEt<sub>2</sub> (> CEt<sub>2</sub>) e ESt<sub>2</sub> (>> ESt<sub>3</sub>). O AGE 22:1 apresentou também valores mais altos em SH, SHC e ESt<sub>2</sub> (>> ESt<sub>3</sub>), mas ao contrário dos anteriores CE >> CNE. Tal como foi observado para outras espécies (114), os ESt<sub>2</sub> constituíram a amostra cujo perfil acil nos ésteres mais se assemelhou aos lípidos de reserva descrito para as sementes de linho. Este resultado parece mostrar que as reservas acumuladas nos embriões jovens germinados *in vitro*, a partir de *calli* embriogénico têm composição semelhante às acumulados nas sementes.

Pouco se sabe sobre a regulação da produção de TAGs e da qualidade dos grupos acil em espécies com sementes ricas em linolenato, como o linho (67). Do mesmo modo, a formação e regulação de ésteres de *n*-alcanóis, potenciais lípidos de reserva em tecidos não integrados em sementes, também não está documentada. Estes tipos de lípidos, que podem integrar ácidos gordos pouco comuns e ser produzidos em células e tecidos somáticos, podem ser importantes do ponto de vista da produção *in vitro* de ácidos gordos de elevado interesse.

### *Conclusões e perspectivas*

Estratégias biotecnológicas eficazes, com o objectivo do melhoramento de oleaginosas no que diz respeito ao rendimento em óleo mas também à manipulação da sua composição acil, dependem não só do conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que controlam a biossíntese de lípidos de reserva nas sementes (114) mas também do alargamento desse conhecimento ao nível dos tecidos e células cultivadas *in vitro*. O estudo do sistema embriogénico e o padrão de acumulação de lípidos nos embriões somáticos dará uma informação valiosa nesse sentido (103).

A construção de plantas transgénicas abriu já um novo potencial naquela optimização, permitindo por um lado o estudo dos mecanismos reguladores e a função dos ácidos gordos, e por outro, abrindo a possibilidade de se introduzirem genes relevantes, existentes em espécies menos interessantes do ponto de vista agro-industrial, em espécies com maior interesse económico. Em transferências génicas com o objectivo da produção de lípidos de reserva das sementes que integrem determinados ácidos gordos específicos, poderá utilizar-se virtualmente qualquer ácido gordo visto parecer não haver grandes constrangimentos funcionais na composição acil naquela classe de lípidos (98).

Este trabalho veio revelar que as culturas de linho também poderão dar um contributo nesta área de investigação. O facto das culturas de *calli* em fase de crescimento exponencial acumularem ésteres de ácidos gordos economicamente relevantes, abre a possibilidade de se poderem adaptar à escala industrial para a produção desses metabolitos. Por exemplo, a produção de PUFA's tem interesse para a nutrição humana (70); 18:3 é ainda o precursor de EPA (*cis* 20:5), um ácido gordo de uso farmacêutico (101); 12:0, acumulado em elevados níveis nos *calli* não-embriogénicos, é também um importante recurso farmacológico (ref.) e industrial (113) sendo tradicionalmente extraído dos óleos de coco e palma para o fabrico de detergentes. De entre os VLCFA, que se acumulam mais especificamente nos *calli* embriogénicos, 22:1 é particularmente importante na produção de erucamida, um agente usado na indústria de filmes plásticos (113). Os ésteres de SCFA são importantes para a indústria dos lubrificantes e cosmética (113). A observação desta diversidade na composição acil nos constituintes lipídicos dos diferentes tipos de tecidos, poderá traduzir uma diversidade nas enzimas presentes ou activas. O estudo destes padrões enzimáticos nos diferentes tecidos será certamente relevante na perspectiva da manipulação genética da composição de ácidos gordos das espécies oleaginosas (69) e na exploração da regulação do metabolismo via introdução de cDNAs codificantes de enzimas modificadas da biossíntese de lípidos (114).

Presentemente os PUFA's são obtidos comercialmente a partir de espécies seleccionadas. O ácido linolénico é obtido de *Linum* spp (4 - 21 % peso fresco) e, alternativamente, de *Chlorella* spp (0,9 - 1,7 %). Tem-se contudo tornado evidente, que a produção a partir dos recursos tradicionais se está a tornar inadequada para responder ao mercado em expansão, quer em termos de qualidade quer em termos de quantidade (39). A deficiente oferta advém fundamentalmente de desvantagens intrínsecas das culturas, tais como as variações sazonais e climáticas e baixa produtividade económica. Torna-se necessário, portanto, a procura de fontes alternativas, sendo a engenharia genética e o uso de organismos inferiores uma das vias (39). Uma outra solução alternativa seria o uso de culturas de tecidos ou de células ricas em determinados ácidos gordos, que por um lado colmatam as desvantagens das espécies cultivadas, do tempo, da heterogeneidade do material e por outro, constitui uma solução com menor impacto social quando comparada com o uso de plantas transgénicas. Por outro lado, a manipulação do meio, no que diz respeito à fonte de carbono (61) e reguladores de crescimento utilizados (27, 32) poderá ainda alargar a possibilidade de manipulação dos ácidos gordos pretendidos.

## Bibliografia

- 1 **Harwood** J.L., Price-Jones M.J., Jones P.L., Page R.A., Ramli U.S. e Quant P.A. (2000) The control of lipid biosynthesis in plants. *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.* 4, 147-155.
- 2 **Weselake** R. (2000) Lipid biosynthesis in cultures of oilseed rape. *In Vitro Plant Cell. Dev. Biol.* 36, 338-348.
- 3 **Somerville** C., Browse J., Jaworski J. e Ohlrogge J., Lipids. *In: B.B. Buchanan, W. Gruissen e R.L. Jones (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000, pp. 456-527.
- 4 **Lightner** J., James D.W., Dooner H.K. e Browse J. (1994) Altered body morphology is caused by increased stearate level in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 6, 401-412.
- 5 **Reidiboym-Talleux** L. e March G.G. (1999) Lipid and fatty acid composition in non-embryogenic calli and embryogenic tissues in wild cherry (*Prunus avium*). *Physiol. Plantarum* 105, 513-520.
- 6 **Millar** A.A., Wrischer M. e Kunst L. (1998) Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology. *The Plant Cell* 11, 1889-1902.
- 7 **Browse** J., McCourt P. e Somerville C. (1986) A mutant of *Arabidopsis* deficient in C18:3 and C16:3 leaf lipids. *Plant Physiol.* 81, 859-864.
- 8 **Giese** B.N. (1975) Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry* 14, 921-929.
- 9 **Liu** W., Hildebrand D.F. e Collins G.B. (1995) Auxin-regulated changes of fatty acid content and composition in soybean zygotic embryo cotyledons. *Plant Sci.* 106, 31-42.
- 10 **Fell** D., *Understanding the Control of Metabolism.* Portland Press, London, 1997.
- 11 **Tonnet** M.L. e Green A.G. (1987) Characterization of the seed and leaf lipids of high and low linolenic acid flax genotypes. *Arch. Biochem. Biophys.* 252 (2), 646-654.
- 12 **Green** A.G. e Marshall D.R. (1981) Variation for oil quantity and quality in linseed (*Linum usitatissimum*). *Aust. J. Agric. Res.* 32, 599-607.
- 13 **Stymne** S., Tonnet M.L. e Green A.G. (1992) Biosynthesis of linolenate in developing embryos and cell-free preparations of high-linolenate linseed (*Linum usitatissimum*) and low-linolenate mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (2), 557-563.

- 14 **Pretová A.**, Flax (*Linum usitatissimum* L.): embryo culture studies. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 10 Legumes and Oilseed Crops I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990, pp. 515-537.
- 15 **Harwood J.L.** (1988) Fatty acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 101-138.
- 16 **Hitchcock C.** e James A.T. (1966) The mechanism of  $\alpha$ -oxidation in leaves. Bioch. Biophys. Acta 116, 413-424.
- 17 **Hietala T.**, Hiekkala P., Rosenqvist H., Laakso S., Tahvanainen L. e Repo T. (1998) Fatty acid and alkane changes in willow during frost-hardening. Phytochemistry 47, 1501-1507.
- 18 **Roughan P.G.**, Mudd J.B., McManus T.T. e Slack C.R. (1979) Linoleate and  $\alpha$ -linolenate synthesis by isolated spinach chloroplasts. Biochem. J. 18, 571-574.
- 19 **Ohlrogge J.** e Browse J. (1995) Lipid biosynthesis. The Plant Cell 7, 957-970.
- 20 **Avjoglou A.** e Knox R.B. (1989) Storage lipid accumulation by zygotic and somatic embryos in culture. Annals of Botany 63, 409-420.
- 21 **Beevers H.** (1979) Microbodies in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 159-193.
- 22 **Schuchmann R.** e Wellmann E. (1983) Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism. Plant Cell Reports 2, 88-91.
- 23 **Hakman I.** (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. Physiol. Plantarum 87, 148-159.
- 24 **Mhaske V.B.** e Hazra S. (1994) Appearance of storage lipid (triglycerides) in somatic embryos of peanut (*Arachis hypogaea* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P, 113-116.
- 25 **Choi Y.E.**, Yang D.C., Kim H.S. e Choi K.T. (1997) Distribution and changes of reserve materials in cotyledon cells of *Panax ginseng* related to direct somatic embryogenesis and germination. Plant Cell Reports 16, 841-846.
- 26 **Dehesh K.**, Edwards P., Hayes T., Cranmer A.M. e Fillatti J. (1996) Two novel thioesterases are key determinants of the bimodal distribution of acyl chain length of *Cuphea palustris* seed oil. Plant Physiol. 110, 203-210.
- 27 **Slabas A.R.**, Roberts P.A., Ormesher J. e Hammond E.W. (1982) A model system for studying the mechanism of medium-chain fatty acid biosynthesis in plants. Bioch. Biophys. Acta 711, 411-420.
- 28 **Hara S.**, Falk H. e Kleinig H. (1985) Starch and triacylglycerol metabolism related to somatic embryogenesis in *Papaver orientale* tissue cultures. Planta 164, 303-307.
- 29 **Turnham E.** e Northcote D.H. (1984) The incorporation of [1-<sup>14</sup>C]acetate into lipids during

- embryogenesis in oil palm tissue cultures. *Phytochemistry* 23, 35-39.
- 30 **Joy R.W.**, Yeung E.C., Kong L. e Thorpe T. (1991) Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27, 32-41.
- 31 **Warren G.S.** e Fowler M.W. (1979) Changing fatty acid composition during somatic embryogenesis in cultures of *Daucus carota*. *Planta* 144, 451-454.
- 32 **Carriere F.**, Chagvardieff P., Gil G., Pean M., Sigoillot J.C. e Tapie P. (1990) Paraffinic hydrocarbons in heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. *Plant Sci.* 71, 93-98.
- 33 **Pandey B.** e Gadgil V.N. (1984) Fatty acids in callus cultures: influence of growth factors on fatty acid composition of total lipids in callus cells. *Phytochemistry* 23, 51-53.
- 34 **Liu W.**, Hildebrand D.F. e Collins G.B. (1995) Auxin-regulated changes of fatty acid content and composition in soybean zygotic embryo cotyledons. *Plant Sci.* 106, 31-42.
- 35 **Fernandes-Ferreira M.** Constituintes Lipídicos Produzidos por Plantas Espontâneas e Micropropagadas, Calli e Células em Suspensão de *Euphorbia characias* L. Subsp. *characias*. Tese de Doutorado, Universidade do Minho, 1992.
- 36 **Mason M.E.** e Waller G.R. (1964) Dimetoxipropane induced transesterification of fats and oils in preparation of methyl esters for chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 36, 583-586.
- 37 **Metcalfe L.D.**, Schmitz A.A. e Pelka J.R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38, 514-515.
- 38 **Luddy F.E.**, Barford R.A., Herb S.F. e Magidman P. (1968) A rapid and quantitative procedure for preparation of methyl esters of butteroil and other fats. *J. Am. Chem. Oil Chem. Soc.* 45, 549-552.
- 39 **Halder T.** e Gadgil V.N. (1984) Fatty acid in callus cultures: stage of reversal in the proportion of unsaturated to saturated acids and of change in major components. *Phytochemistry* 23, 47-49.
- 40 **Harwood J.**, Phosphoglycerids of mitochondrial membranes: *In*: S.P.Colowick e N.O. Kaplan (Eds) *Methods in Enzymology, Plant Cell Membranes*. Vol. 148, Academic Press, San Diego, CA., 1987, pp. 475-490.
- 41 **Conconi A.**, Miquel M., Browse J.A. e Ryan C.A. (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111, 797-803.
- 42 **Ryu S.B.** e Wang X. (1998) Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves. *Bioch. Biophys. Acta* 1393, 193-202.
- 43 **Browse J.** e Slack C.R. (1985) Fatty-acid synthesis in plastids from maturing safflower and



- linseed cotyledons. *Planta* 166, 74-80.
- 44 **Carrier D.J.**, Cunningham J.E., Taylor D.C. e Dunstan D.I. (1997) Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16, 550-554.
  - 45 **Feussner I.**, Wasternack C., Kindl H. e Kuhn H. (1995) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11849-11863.
  - 46 **Siedow J.N.** (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 145-188.
  - 47 **Williams M.**, Francis D., Hann A.C. e Harwood J.L. (1991) Changes in lipid composition during callus differentiation in cultures of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* 42(245), 1551-1556.
  - 48 **Aziz A.** e Larher F. (1998) Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.* 153, 754-762.
  - 49 **Iqbal G.** e Valivety R. (1997) Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (a review). *Tibtech* 15, 401-409.
  - 50 **Harwood J.L.**, Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. *In*: P.K. Stumpf (Ed.) *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Academic Press, New York, 1980, pp. 1-55.
  - 51 **Hitchcock C.** e Nichols B.W. *Plant Lipid Biochemistry*, Academic Press, New York, 1971.
  - 52 **Husemann W.**, Radwan S.S., Mangold H.K. e Barz W. (1980) The lipids in photoautotrophic and heterotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta* 147, 379-383.
  - 53 **Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. e Watson J. (Eds) *Energy conversion: mitochondrion and chloroplasts. In: Molecular Biology of the Cell. (3<sup>rd</sup> Edition)*, Garland Publishing, Inc., New York, 1994, pp 653-720.
  - 54 **Ryu S.B.** e Wang X. (1996) Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Bioch. Biophys. Acta* 1303, 243-250.
  - 55 **Thies W.**, Chloroplast development and biogenesis of linolenic acid in ripening cotyledons of rapeseed. *In: Proc. Int. Conf. Sci., Tecnol. Marketing of Rapeseed and Rapeseed Products*. Rapeseed Assn. Canada, Ohawa, 1970, pp. 348-356.
  - 56 **Martins L.O.**, Jurado A.S. e Madeira V. (1990) Composition of polar lipid acyl chains of *Bacillus stearothermophilus* as affected by temperature and calcium. *Bioch. Biophys. Acta* 1045, 17-20.

- 57 **Eccleston** V.S., Cranmer A.M., Voeler T.A. e Ohlrogge J.B. (1996) Medium-chain fatty acid biosynthesis and utilization in *Brassica napus* plants expressing lauryl-acyl carrier protein thioesterase. *Planta* 198, 46-53.
- 58 **Zimmerman** D.C. e Klosterman J. (1965) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 42, 58.
- 59 **Poirier** Y., Ventre G. e Caldelari D. (1999) Increased flow of fatty acids towards  $\beta$ -oxidation in developing seeds of *Arabidopsis* deficient in diacylglycerol acyltransferase activity or synthesizing medium-chain-length fatty acids. *Plant Physiol.* 121, 1359-1366.
- 60 **Bruck** F.M., Brumel M., Schuch R. e Spener F. (1996) In-vitro evidence for feed-back regulation of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in medium-chain fatty acids biosynthesis. *Planta* 198, 271-278.
- 61 **Hilditch** T.P. e Williams P.N. *In: P.A. Sienenthaler (Ed.) The Chemical Constitution of Natural Fats.* Wiley, New York, 1964, pp. 332-343.
- 62 **Kroumova** A.B., Xie Z. e Wagner G.J. (1994) A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11437-11441.
- 63 **Kolattukudy** P.E. e Buckner J.S. (1972) Chain elongation of fatty acids by cell-free extracts of epidermis from pea leaves (*Pisum sativum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46 (2), 801-807.
- 64 **Harwood** J.L. (1996) Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids (a review). *Bioch. Biophys. Acta* 1301, 7-56.
- 65 **Stymne** S. e Stobart A.K. (1985) Oil synthesis in vitro in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta* 164, 101-104.
- 66 **Okuley** J., Lightner J., Feldman K., Yadav N., Lark E. e Browse J. (1994) *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *The Plant Cell* 6, 147-158.
- 67 **Shimizu** S., Kawashima H., Akimoto K., Shinmen Y. e Yamada H. (1989) Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid-containing oil by *Mortierella alpina* 1S-4 at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1-4.

# VI

---

*Variações dos Lípidos Totais e das Fracções Neutra e Ácida Durante a  
Embriogénese Somática de Linho (Linum usitatissimum L.):*

*II – Variação Ontogénica do Teor, Composição e Distribuição de n-Alcanos.*

*Este capítulo foi baseado no artigo:*

*“Ontogenic Variations in n-Alkanes During Somatic Embryogenesis of Flax (Linum usitatissimum L.)”.*

Cunha A. e Fernandes-Ferreira M. (2001) Plant Science 160, 1137-1143.

## Resumo

Este trabalho experimental inseriu-se no estudo sobre ontogénese lipídica associada à embriogénese somática e desenvolvimento das culturas de linho, cuja descrição foi iniciada no capítulo anterior, e teve como objectivo específico o estudo da variação da fracção de *n*-alcanos. Os explantes primários utilizados, a metodologia para obtenção das culturas, os métodos de amostragem e de análise foram os descritos nesse capítulo. A partir das culturas colhidas ao longo do período experimental ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ) analisou-se a composição e o padrão de distribuição dos *n*-alcanos nas diferentes amostras. A quantificação destes compostos foi feita por GC por análise da fracção neutra não derivatizada do extracto lipídico. A identificação foi confirmada por GC-MS. Em todas as amostras de material vegetal – SH, SHC, CNE, CE e ES respectivos – foi encontrada uma distribuição normal assimétrica de *n*-alcanos na gama das baixas massas moleculares ( $C_{13}$ - $C_{21}$ ). O conteúdo de *n*-alcanos mais elevado verificou-se nos explantes primários (SH) e nas primeiras fases de desenvolvimento de *calli* (SHC). *n*-Alcanos de cadeias mais longas foram observados apenas em tecidos maduros (*calli* em fase estacionária) e estruturas diferenciadas (SH, SHC e ES). Embora em *calli* e em ES o conteúdo de *n*-alcanos tivesse diminuído com o tempo, observou-se que a acumulação destes compostos nos *calli* embriogénicos foi significativamente inferior à dos *calli* não-embriogénicos, sendo que esta diferença era independente do tempo de cultura. Os resultados sugerem a utilização de *n*-alcanos para o crescimento celular heterotrófico e a sua mobilização de CE para os embriões somáticos em desenvolvimento.

## Introdução

Os *n*-alcanos são compostos hidrocarbonados saturados de cadeia linear ( $C_nH_{2n+2}$ , abreviado para  $C_n$ ), amplamente distribuídos pelo reino vegetal, encontrando-se particularmente associados às ceras epicuticulares das folhas de plantas superiores. Estas moléculas altamente hidrofóbicas são componentes importantes para a manutenção do balanço hídrico das plantas (1), contribuindo significativamente para a capacidade impermeabilizante que é característica das cutículas (*senso lato*). Embora os *n*-alcanos surjam algumas vezes como constituintes de fracções neutras de extractos de lípidos internos, i.e. não relacionados com as ceras epicuticulares, a sua função fisiológica é aí relativamente desconhecida.

Durante os últimos 30 anos, vários estudos têm mostrado que apesar da grande variabilidade nos teores e padrões de distribuição de *n*-alcanos encontrada nas diferentes espécies, as ceras epicuticulares são basicamente compostas pela série homóloga  $C_{17}$ - $C_{35}$ , com uma predominância típica pelos *n*-alcanos de cadeia ímpar e com o  $C_{29}$  e/ou  $C_{31}$  como componentes maioritários (2). Os *n*-alcanos internos apresentam tipicamente cadeias mais curtas, sendo a distribuição da série homóloga geralmente mais achatada ou do tipo gaussiana e sem predominância por compostos de cadeia par ou ímpar (3, 4). A grande maioria dos estudos realizados com *n*-alcanos em plantas referem-se à determinação destes compostos em folhas de material colhido *in situ* ou mantido em estufas, mas raramente em material não foliar ou induzido *in vitro*. Este facto revela que a maior parte dos dados disponíveis na literatura se referem a *n*-alcanos de ceras epicuticulares, que são os mais importantes do ponto de vista da ecologia das espécies e da adaptação das plantas ao meio terrestre. A elevada coerência e especificidade encontrada no padrão de distribuição dos *n*-alcanos nas folhas e o seu potencial papel na adaptação das plantas explicam o facto destes hidrocarbonetos foliares serem extensivamente explorados como marcadores químicos de elevado valor taxonómico (5-10).

O mecanismo de biossíntese dos *n*-alcanos é pouco conhecido. Foram descritas duas vias básicas que operam na biossíntese dos *n*-alcanos externos; a “via da condensação”, postulada para a síntese de *n*-alcanos de *Nicotiana tabacum* por Kaneda (11) e a “via da elongação” proposta por Eglinton e Hamilton (12), mais recentemente revista por Somerville *et al.* (13) para explicar a síntese dos componentes das ceras epicuticulares. A figura VI.1, mostra que os precursores das ceras epicuticulares são derivados de compostos FAS produzidos nos plastídeos de células epidérmicas e que após exportação, os ácidos gordos são elongados no RE via sistema FAE como ésteres CoA ( $C_{26}$ -CoA a  $C_{32}$ -CoA). Estes ácidos gordos esterificados podem posteriormente ser reduzidos a alcoóis primários ou a aldeídos. Estes últimos poderão depois sofrer descarbonilação no citosol formando os *n*-alcanos  $C_{n-1}$  de cadeia longa.

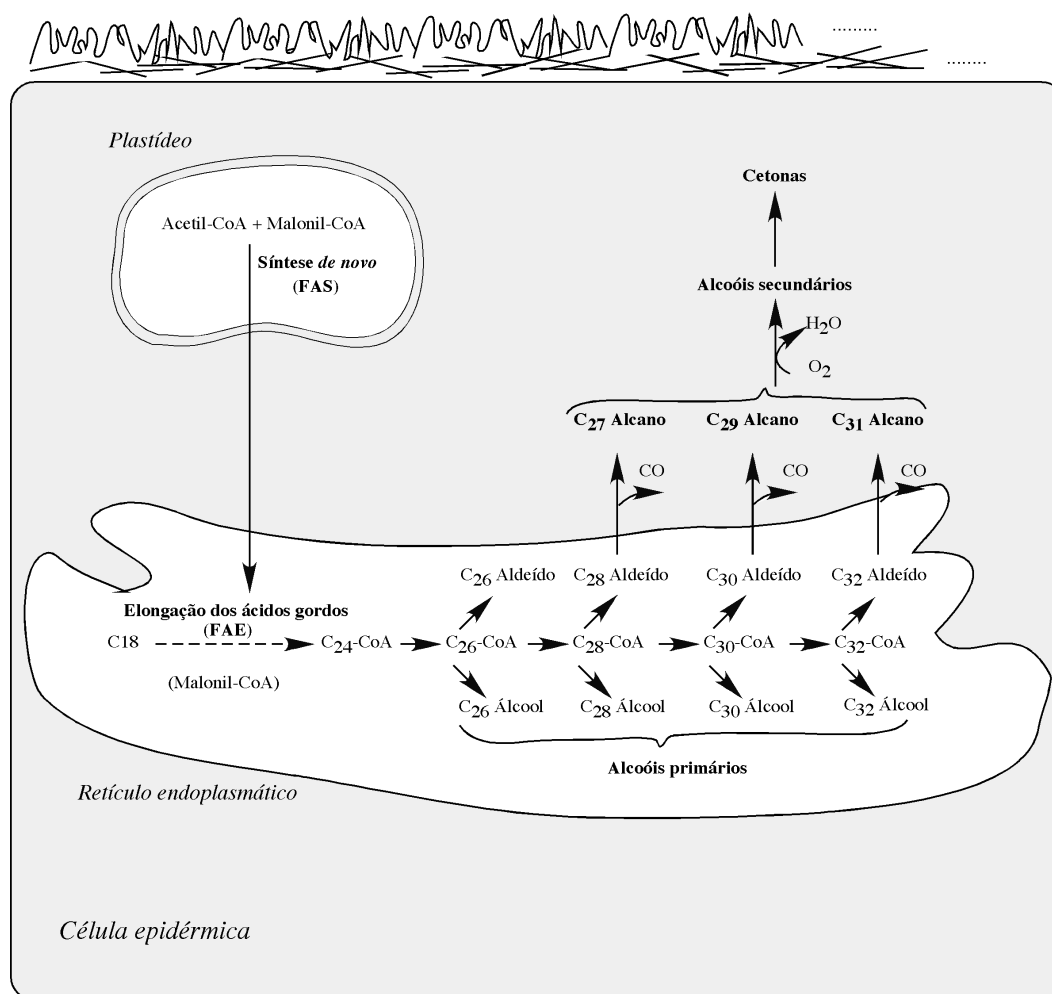


Figura VI.1- Via proposta para a síntese dos principais componentes das ceras epicuticulares: alcoóis primários e secundários, alcanos e cetonas [adaptado de Somerville *et al.* (13)].

A composição lipídica, incluindo os *n*-alcanos, é controlada por factores genéticos e ambientais (14, 15). Entre muitos outros exemplos encontrados na literatura, foi referido que a idade da folha (16-18), o tipo de órgão na planta (7), o tipo de tecido (3) a posição da espécie na escala evolutiva (4, 8), a radiação (14), a temperatura de crescimento (14, 19) e as adaptações ao frio (20) podem influenciar o teor e/ou o padrão de distribuição dos *n*-alcanos. Ainda pouco é conhecido sobre as modificações lipídicas ocorridas durante a indução e expressão da embriogénese somática (21) mas, ao que se sabe, não existem referências relacionadas com variações de *n*-alcanos durante aquele processo. As referências encontradas na literatura sobre variações destes compostos em culturas *in vitro* encontram-se relacionadas com o modo de obtenção de carbono e energia de células em suspensão de *Euphorbia characias* L. (22) e com a capacidade morfogénica de culturas de tecidos de *Nicotiana tabacum* (3).

O principal objectivo deste trabalho foi determinar as **variações ontogénicas** ocorridas nos teores e padrões de distribuição dos *n*-alcanos associadas:

- à indução e expressão da **embriogénese somática** a partir de segmentos sub-cotiledonares (SH) de linho (*Linum usitatissimum* L.) e
- ao **crescimento** de *calli* embriogénicos e não-embriogénicos.

## *Material e Métodos*

### *1 – Explantes primários, meio de cultura e condições de crescimento*

Os explantes primários utilizados, o meio de cultura de indução de embriogénese somática e as condições ambientais em que foram mantidas as culturas de linho para este ensaio experimental encontram-se descritas na secção de Material e Métodos do capítulo anterior.

### *2 – Amostragem e descrição do material vegetal usado para análise química*

O material vegetal utilizado nesta experiência foi o mesmo material usado na experiência descrita no capítulo anterior, pelo que o método de amostragem utilizado, o diferente material vegetal colhido e preparado em cada amostragem foram idênticos ao que aí foi descrito.

### *3 – Análise de n-alcanos*

A análise dos *n*-alcanos foi realizada nas fracções neutras (N) dos extractos obtidos de todas as amostras, de acordo com as metodologias descritas na secção 3.1 do capítulo anterior.

Os *n*-alcanos presentes nas referidas fracções neutras foram igualmente analisados por cromatografia gasosa (GC), identificados por comparação com padrões autênticos e quantificados pelo método do padrão interno (p.i.). Ao contrário das análises efectuadas para quantificar os ácidos gordos livres e ácidos gordos esterificados, que necessitaram de derivatização prévia, os *n*-alcanos foram analisados directamente a partir das fracções neutras sem qualquer tratamento de derivatização. Um volume de fracção N (massa de extracto na gama de 1-4 mg) foi reduzido a peso constante sob fluxo de azoto sendo posteriormente adicionado o p.i. (5- $\alpha$ -colestano) numa proporção de amostra para p.i. de 6-20:1 (p/p). Por cada replicado foram realizadas pelo menos 3 análises e a



identificação foi confirmada por GC-MS. As características das colunas utilizadas e as condições operacionais de análise encontram-se descritas na Tabela VI.1.

Tabela VI.1 – Descrição das características das colunas utilizadas e das condições operacionais de análise em cromatografia gasosa dos *n*-alcanos presentes nas fracções N.

GC	Aparelho Perkin Elmer 8600 com injector split-splitless a 300 °C, detector FID a 320 °C, coluna BP5 (J&W Scientific) 25 m x 0,22 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme (5% fenil dimetilsiloxano)
GC-MS	Aparelho Perkin Elmer 8500 com injector split-splitless a 300 °C, coluna DB5 (J&W Scientific) 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme (5 % fenil dimetilsiloxano) – detector de captura de iões (ITD Finnigan MAT) operando em modo EI a 70 eV
Programa térmico, gases e pressão na coluna	100 °C - 280 °C (5 °C/min) seguido de isotérmica 15 min. H <sub>2</sub> e He <sub>2</sub> como gases de arraste em GC e GC-MS, respectivamente, a uma pressão de 12 PSI

FID – Detector de ionização de chama

ID – Diâmetro interno

EI – Impacto electrónico

### 3.1 – Identificação e quantificação dos *n*-alcanos

Para se proceder à identificação dos *n*-alcanos foi preparada uma mistura de 18 *n*-alcanos, (SIGMA) de pureza superior a 99 %, dissolvidos em *n*-hexano em concentrações conhecidas que variaram de 0,4 a 1,3 mg/ml. Utilizou-se a série homóloga C<sub>14</sub>-C<sub>32</sub>, com excepção de C<sub>31</sub>, tendo-se adicionado o padrão interno numa proporção de 2-4:1 (p/p). A série padrão foi analisada em GC de modo idêntico ao descrito para as amostras.

Nas condições experimentais utilizadas, e tendo em consideração o intervalo de tempo correspondente ao incremento linear térmico da coluna (36 min.), a relação entre o tempo de retenção cromatográfica (TR) dos *n*-alcanos e o seu número de átomos de carbono (nº C) pode ser descrita matematicamente por uma função linear, a função que geralmente descreve a dependência de TR pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada em rampa térmica (fig. VI.2). No entanto, verificou-se que esta relação foi descrita mais adequadamente por uma função logarítmica (base natural) (comparar coeficientes de

determinação ( $r^2$ ), fig. VI.2). Para o cálculo destas funções só foram considerados os padrões  $\leq C_{29}$  visto os  $n$ -alcanos com maior número de carbonos estarem fora do intervalo de incremento linear térmico. Como se pode verificar pela figura VI.2 os valores que ficam para fora daquele intervalo confirmam que a função que melhor descreverá a relação é a logarítmica. Todos os  $n$ -alcanos, incluindo os de cadeia superior a  $C_{29}$ , foram identificados por GC e GC-MS, por comparação dos respectivos TR e espectros de massa com os de padrões obtidos comercialmente.

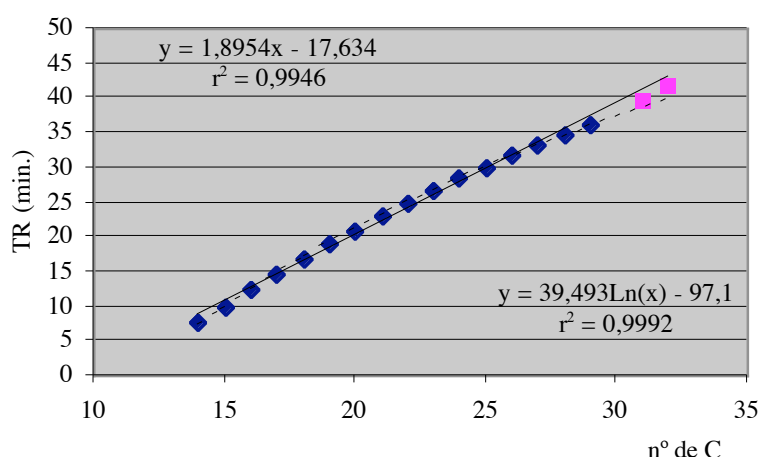


Figura VI.2 – Relação entre os tempos de retenção (TR) apresentados pelos  $n$ -alcanos e o respectivo número de átomos de carbono. As funções foram calculadas a partir dos  $n$ -alcanos  $\leq C_{29}$  que são os que apresentam TR  $\leq 36$  min. e estão representados por losangos. Os pontos representados por quadrados correspondem aos  $C_{31}$  e  $C_{32}$ . As equações das duas funções que descrevem a relação (linear e logarítmica) e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) encontram-se inscritos na figura. As barras de erro (SE) encontram-se abaixo do limite de detecção visual.

Para determinar o factor de correlação (FC) para a série padrão foram realizadas 5 análises em GC. Ao representar-se graficamente todos os  $O_i/E_i$  médios em função do número de átomos de C do  $n$ -alcano respectivo, verificou-se que o modelo que descrevia a relação entre aquelas variáveis não era regular (fig. VI.3). Parece haver dois patamares ( $C_{14}$ - $C_{17}$  e  $C_{24}$ - $C_{27}$ ) onde a razão O/E não varia com o nº de C e duas zonas ( $C_{18}$ - $C_{24}$  e  $C_{27}$ - $C_{32}$ ) onde existe uma proporcionalidade inversa entre as variáveis (fig. VI.3). A reprodutibilidade das análises dos  $n$ -alcanos (medida pelo CV) é muito afectada pelo composto em questão, sendo o CV mínimo em  $C_{23}$  (0,27 %) aumentado abruptamente até ca. 7 % para compostos com número de C sucessivamente menores ou

maiores (dados não mostrados). Por este motivo e porque não se encontrou explicação para aquele fenómeno, imputámos o desvio à linearidade esperada, a erros experimentais.

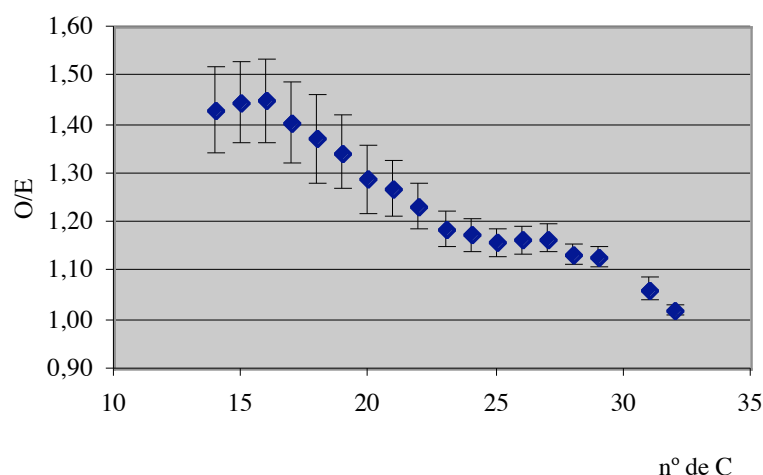


Figura VI.3 – Relação entre o comprimento da cadeia dos *n*-alcanos (nº de C) e a razão O/E (*n*-alcanos observados ( $O_i$ ) sobre os esperados ( $E_i$ )). As barras de erro correspondem a  $\pm$ SE.

Ao representar graficamente a razão  $(O/E)_{(i+1)} / (O/E)_i$  (abreviadamente  $i+1/i$ ) em função do nº de átomos de carbonos ( $C_{i+1}$ ) dos *n*-alcanos verificou-se que a razão  $i+1/i$  não dependia significativamente do tamanho da cadeia (fig. VI.4). Este resultado mostrou que seria possível encontrar um factor de correção com base nesta razão. Como o declive da função não é nulo (fig. VI.4) em vez de se usar a ordenada na origem, estimou-se a média das  $i+1/i$  que foi igual a 0,98 (SD = 0,017). O factor de correção estimado para os *n*-alcanos, quando quantificados com o 5- $\alpha$ -colestano como padrão interno, foi  $FC = 0,98^{(C_i+1)}$ , em que  $C_i$  corresponde à diferença entre o número de carbonos do  $C_{32}$  e do *n*-alcano *i*.

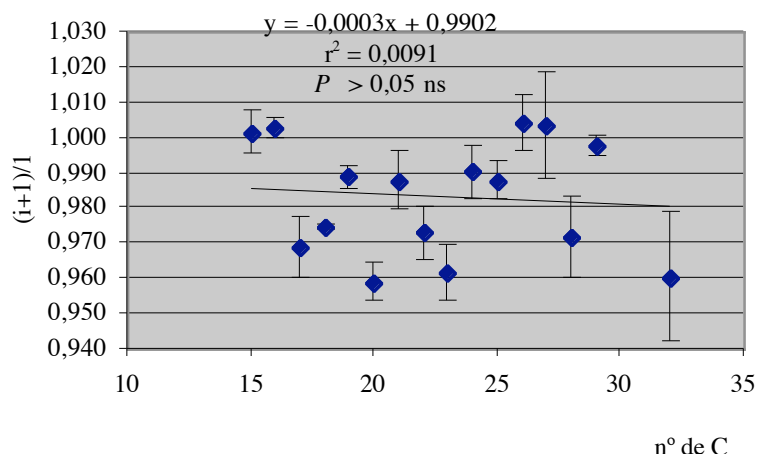


Figura VI.4 – Relação entre as razões  $i+1/i$  e os  $n$ -alcanos  $C_{i+1}$ . As barras de erro correspondem a  $\pm$ SE.

#### 4 - Análise estatística

As diferenças encontradas nos teores de  $n$ -alcanos como percentagem dos lípidos totais foram analisadas estatisticamente recorrendo ao teste de análise de variâncias (ANOVA) e as comparações *post hoc* entre as várias amostras foram realizadas através do teste Duncan ( $P < 0,05$ ). A variável estudada não era homocedástica (teste Bartlett  $P > 0,05$ ), pelo que se procedeu à transformação da variável pela função “raíz quadrada”. Os dados apresentados são, contudo, os valores originais determinados. Foram efectuadas análises de correlação ( $P < 0,05$ ) de modo a estudar as relações entre os teores de  $n$ -alcanos individuais nos diferentes tipos de tecidos. Neste tipo de análise utilizaram-se apenas os compostos comuns aos dois tipos de tecido em questão. Estas análises foram realizadas no programa Statistica@4.1 da StatSoft, Inc.

## Resultados e Discussão

### 1 – Variações dos teores específicos de *n*-alcanos durante a embriogênese somática

Como já anteriormente tinha sido discutido, ocorreu diminuição gradual do teor de lípidos totais associada à indução e crescimento de *calli*, de SH a *calli* t<sub>3</sub>, não se tendo, porém, verificado qualquer relação daquela variável com a capacidade embriogénica dos *calli* ou com o desenvolvimento dos embriões (Tabela VI.2).

Tabela VI.2 – Teores de lípidos totais e de *n*-alcanos em segmentos de hipocótilo (SH), segmentos de hipocótilo com desenvolvimento de *calli* nas superfícies de corte (SHC), *calli* não-embriogénicos (CNE), *calli* embriogénicos (CE) e embriões somáticos (ES) obtidos durante o período de ensaio. Para cada variável experimental e em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

Material vegetal	Lípidos totais (% biomassa)				<i>n</i> -Alcanos (% lípidos totais)			
	Tempo de amostragem (semanas)				Tempo de amostragem (semanas)			
	0	2	5	7	0	2	5	7
SH	15,6 a				8,09 a			
SHC		7,03 c				8,13 a		
CNE			3,41 bd	2,03 b			4,54 b	1,53 c
CE			3,45 bd	2,31 b			1,49 c	0,31 d
ES			6,17 c	5,37 cd			8,48 a	2,7*

\* Perdeu-se um duplicado

A proporção de *n*-alcanos nas amostras variou de 0,3 a 8,5 % dos lípidos totais (Tabela VI.2). Estes valores foram semelhantes aos encontrados em *calli* teratogénicos (com capacidade morfogénica) de *Nicotiana tabacum* (3) e em culturas de células autotróficas e fotomixotróficas de *Euphorbia characias* (22). No entanto, foram bastante superiores aos encontrados em *calli* sem capacidade morfogénica (3) e aos de lípidos internos de folhas de *Spinacia oleracea* (1). Embora não se tenha observado variação significativa

durante as primeiras fases de desdiferenciação dos tecidos somáticos e concomitante formação de *calli* ( $t_0$  m  $t_1$ ), verificou-se uma acentuada diminuição do teor de *n*-alcanos em todas as amostras (CNE, CE e ES), de  $t_2$  para  $t_3$  (Tabela VI.2). Contrariamente ao que foi constatado para os lípidos totais, houve diferenças muito significativas nos conteúdos de *n*-alcanos entre *calli* com diferentes capacidades embriogénicas. Quer em  $t_2$  quer em  $t_3$ , os *calli* embriogénicos apresentaram teores destes compostos significativamente mais baixos que os de *calli* não-embriogénicos, sendo que a razão desses teores (CNE/CE) encontrada em  $t_2$ , quase duplicou em  $t_3$  (Tabela VI.2). Tendo em consideração estes resultados, a variação ontogénica dos *n*-alcanos pode ser perspectivada de duas maneiras: no tempo, onde se verificou um declínio associado com a multiplicação celular e crescimento (*calli* e ES); e no espaço, onde se pode preconizar uma mobilização destes compostos a partir de *calli* embriogénico provavelmente relacionada com a diferenciação de embriões somáticos. Esta ideia de uma mobilização a partir de tecido “maternal” associada à diferenciação de embriões é de certo modo apoiada por resultados obtidos por Joy *et al.* (23) com embriões de *Picea glauca* que mostraram que, as células do suspensor e da região basal dos embriões a ele ligados desempenhavam um papel fundamental no transporte de nutrientes para os embriões em desenvolvimento. A proporção de *n*-alcanos é relativamente baixa, no entanto, como se disse, estes compostos altamente reduzidos têm uma elevada energia livre que pode ser convertida. Por outro lado, como são inertes do ponto de vista químico e altamente hidrofóbicos a sua mobilização não apresenta implicações de equilíbrio osmótico ou electroquímico ou de transportadores membranares específicos. Nunca se encontrou, contudo, descrito para os *n*-alcanos esta função de nutriente ou material de reserva mobilizável.

Os valores mais elevados de *n*-alcanos verificaram-se nas amostras correspondentes a estruturas mais diferenciadas e estruturadas (SH, SHC e ES). Embora não se tenha procedido à quantificação de ceras epicuticulares, assumiu-se que o facto destes tecidos terem apresentado conteúdos em *n*-alcanos superiores aos *calli* se deveu essencialmente à presença de ceras epicuticulares. A maioria dos componentes destas ceras são produzidos ao nível da epiderme, a juzante do sistema FAE. Constituindo os *n*-alcanos um dos seus principais componentes, a explicação encontrada parece apoiada pelos resultados experimentais.

Dado que têm sido definidas diferentes populações de *n*-alcanos com funções essencialmente diferentes, tornou-se importante perceber como se comportavam os *n*-alcanos individualmente neste sistema embriogénico desenvolvido para o linho.

## *2 – Variações na composição da fracção de n-alcanos e no respectivo perfil de distribuição: diferenças associadas à embriogénese somática e ao crescimento*

Encontram-se descritos na literatura dois padrões básicos de distribuição de *n*-alcanos em tecidos vegetais (1, 3, 4, 22). Seguindo a classificação adoptada por Carrière *et al.* (22), o padrão Tipo A é composto por *n*-alcanos de cadeia curta, geralmente com uma distribuição tipo gaussiana, sendo o local de biossíntese ao nível das células do parênquima. O padrão Tipo B é composto por *n*-alcanos de cadeia mais longa, com predominância dos que possuem as cadeias mais longas e com número ímpar de átomos de carbono. Este padrão é tipicamente encontrado nas ceras epicuticulares ocorrendo a respectiva biossíntese nas células epidérmicas. Para além desta classificação (Tipo A e B), encontram-se ainda na literatura referências às classificações População I e II (3) e Grupos A e B (4) para designar padrões de distribuição essencialmente iguais. A População II e o Grupo A são sinónimos do Tipo B.

No sistema desenvolvido para o linho, a população de *n*-alcanos presentes nos tecidos distribuiu-se por uma larga gama de comprimentos da cadeia carbonada, de C<sub>13</sub> a C<sub>31</sub>. Para além de terem sido observados os dois tipos de padrões de distribuição, importantes alterações qualitativas e quantitativas ocorreram no padrão de distribuição dos *n*-alcanos durante a embriogénese somática.

Os segmentos de hipocótilos (SH) apresentaram basicamente um padrão Tipo A assimétrico, com uma gama de dispersão C<sub>13</sub>-C<sub>21</sub> e centrado unimodalmente em C<sub>16</sub>-C<sub>17</sub>. Os *n*-alcanos de cadeia média (C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub>) e de cadeia longa (C<sub>27</sub>-C<sub>31</sub>) encontraram-se presentes em pequenas quantidades e apresentaram uma distribuição achatada sem predominância por compostos de cadeia par ou ímpar. Este tipo de tecido caracterizou-se portanto por possuir um padrão Tipo A, muito proeminente e bem definido e, apesar de apresentar *n*-alcanos de cadeia mais longa, não apresentou um padrão Tipo B típico, estando o C<sub>30</sub> e C<sub>31</sub> praticamente ausentes (fig. VI.5). Durante as primeiras fases de desdiferenciação do tecido, com formação de *calli* nas superfícies de corte (SHC), em se tinha constatado não ter ocorrido variações significativas no teor em *n*-alcanos totais

(Tabela VI.2), verificou-se que, apesar de não ter havido alterações relevantes nos *n*-alcanos do Tipo A, tinham ocorrido alterações significativas nos compostos de cadeia mais longa. Concretamente, verificou-se que os compostos C<sub>24</sub>-C<sub>28</sub> desapareceram e os *n*-alcanos de cadeia longa C<sub>30</sub> e C<sub>31</sub> aumentaram (fig. VI.5). Este padrão Tipo B emergente ao fim de duas semanas de cultura, faz pensar que poderá ter ocorrido maturação da cutícula e ceras epicuticulares que cobrem as células epidérmicas não envolvidas ainda na desdiferenciação e formação de *calli*.

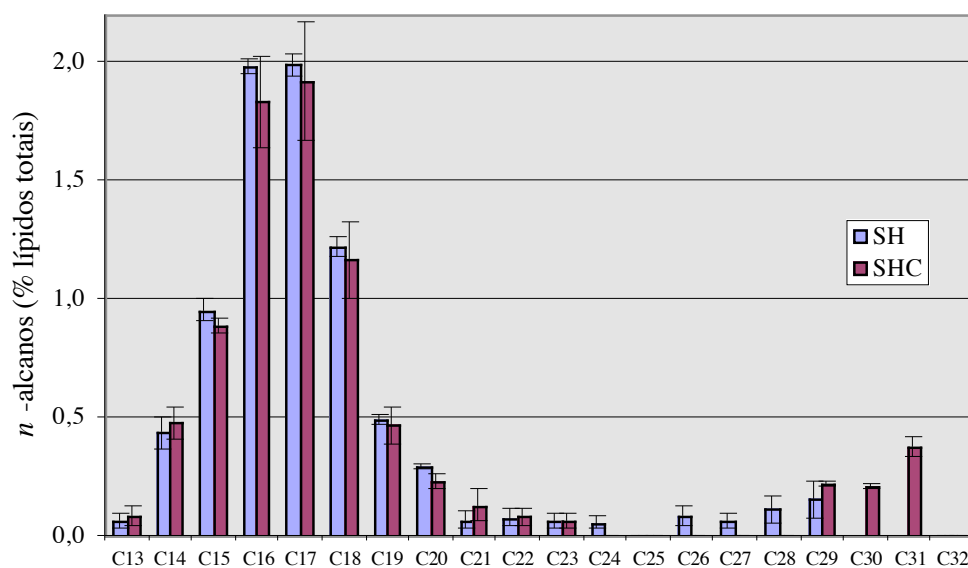


Figura VI.5 – Distribuição dos *n*-alcanos em SH ( $t_0$ ) e SHC ( $t_1$ ). Os hidrocarbonetos encontram-se referenciados pelo número de átomos de carbono (C<sub>i</sub>). Na análise em GC o cromatograma mostrou uma linha de base irregular na zona dos compostos de cadeia muito longa (C>29), no entanto, C<sub>30</sub> e C<sub>31</sub> foram detectados em SH em quantidades vestigiais por GC-MS. Os restantes valores ausentes não foram detectados. As barras de erro correspondem a  $\pm$ SE.

Em *calli* em crescimento exponencial, independentemente da sua capacidade embriogénica, apenas foi encontrado o padrão Tipo A, com a mesma moda e gama de dispersão de compostos que foram observadas em SH e SHC (fig. VI.6). Resultados semelhantes foram obtidos com culturas de células em suspensão de *Euphorbia characias* mantidas em condições heterotróficas ou fotomixotróficas (22). Quando as células foram transferidas para condições fotomixotróficas, o padrão Tipo A foi substituído parcialmente por um padrão Tipo B típico, semelhante ao observado em folhas, com C<sub>29</sub> e C<sub>31</sub> como compostos maioritários. Semelhante ao que foi descrito para os tecidos de hipocótilo (SH), os embriões somáticos jovens (EST<sub>2</sub>) mostraram um



padrão Tipo A bem definido e uma distribuição achatada para os *n*-alcanos de cadeia média e longa sem alternância par-ímpar (fig. VI.6). Duas semanas mais tarde ( $t_3$ ), ambos os tipos de distribuição – A e B – se encontraram presentes nos embriões somáticos (fig. VI.7). Tal como o observado durante a primeira fase do estabelecimento das culturas (SH m SHC), uma diminuição dos *n*-alcanos de cadeia média ocorreu nos ES, de  $t_2$  para  $t_3$ , paralelamente ao aumento dos de cadeia longa e ímpar,  $C_{27}$  e  $C_{29}$  (fig. VI.7). A acumulação de *n*-alcanos Tipo B, característicos de ceras epicuticulares, reforça a ideia de ter ocorrido formação de cutícula, mesmo em condições *in vitro* onde a humidade relativa se encontra perto da saturação. Pensa-se que nestas condições, a pressão para a formação duma barreira impermeabilizante é quase nula, no entanto, há estudos que indicam que mesmo nestas condições ocorre alguma formação de ceras epicuticulares (24), provavelmente devido a determinismos genéticos e do desenvolvimento dos tecidos menos dependentes do controlo ambiental. De facto, enquanto que a quantidade de ceras produzidas é bastante dependente das condições ambientais de crescimento, a composição química é menos influenciada pelos factores ambientais e mais pelas alterações que ocorrem durante o desenvolvimento do tecido (25). A biossíntese e acumulação transiente de *n*-alcanos de cadeia média permanece, no entanto, difícil de explicar.

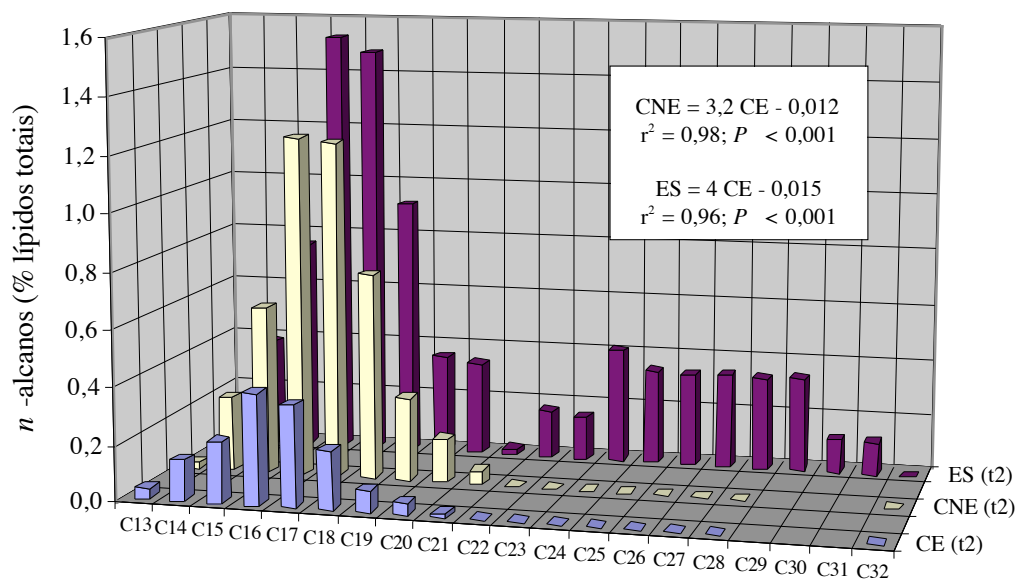


Figura VI.6 – Distribuição dos *n*-alcanos em CNE, CE e ES após 5 semanas de cultura ( $t_2$ ). Os hidrocarbonetos encontram-se referenciados pelo número de átomos de carbono ( $C_i$ ). A caixa inclusa mostra as equações das análises de correlação com os respectivos valores de  $r^2$  e  $P$ . Os valores ausentes foram detectados apenas em quantidades vestigiais por GC-MS. Os SD variaram entre 2 a 28 % do valor da média.

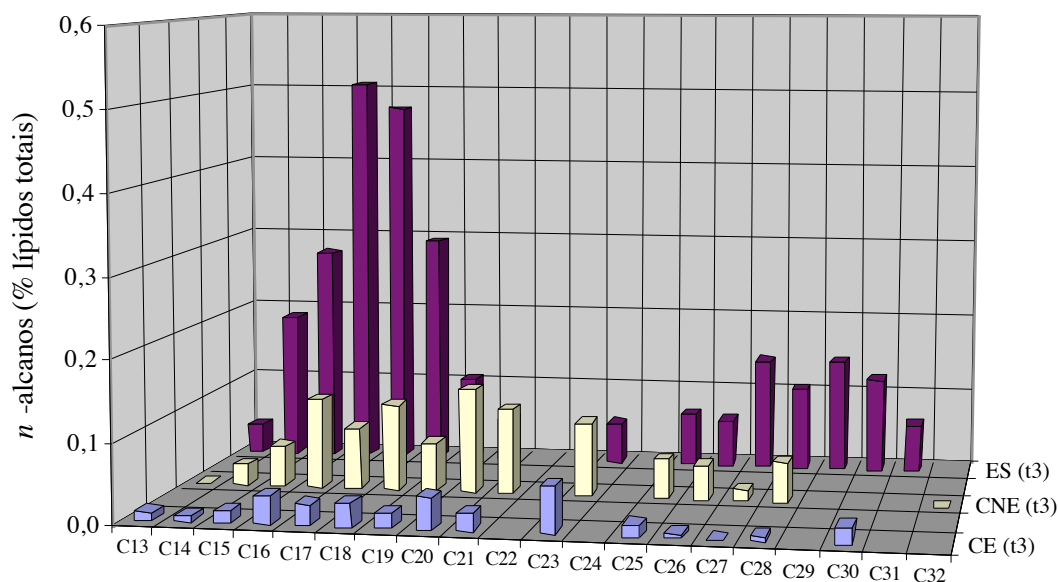


Figura VI.7 – Distribuição dos *n*-alcanos em CNE, CE e ES após 7 semanas de cultura ( $t_3$ ). Os hidrocarbonetos encontram-se referenciados pelo número de átomos de carbono ( $C_i$ ). A ausência de alguns compostos (à exceção de  $C_{32}$  que não foi detectado em qualquer das amostras) deveu-se à ocorrência de interferências com outros constituintes não identificados da fracção neutra. No entanto foram detectados em quantidades vestigiais por GC-MS. Os SD variaram entre 3 a 30 % do valor da média.

Devido à semelhança dos perfis Tipo A nas diferentes amostras obtidas em  $t_2$ , procurou-se determinar se havia alguma correlação significativa entre eles. Encontrou-se uma relação de proporcionalidade estreita entre o conteúdo dos  $n$ -alcanos de Tipo A dos embriões somáticos e o dos *calli* (CNE ou CE) e destes entre si. Ao analisar as equações das funções lineares verificou-se que a acumulação destes  $n$ -alcanos nos embriões somáticos se podia explicar, quase na totalidade, pela diminuição ocorrida nos CE comparativamente aos CNE (fig. VI.6). De facto, o padrão Tipo A, não é típico dos tecidos diferenciados de plantas, podendo o seu aparecimento nos embriões jovens resultar da mobilização dos respectivos  $n$ -alcanos a partir dos tecidos “maternais” (CE) mais do que da sua biossíntese *in situ*. A diminuição acentuada do teor dos  $n$ -alcanos Tipo A nos embriões de  $t_2$  para  $t_3$  (figs. VI.6 e VI.7) apoia esta hipótese. Os  $n$ -alcanos presentes nas sementes e nos lípidos internos podem participar na manutenção da estrutura celular interna (1, 26) e actuar como compostos de reserva energética (26). Aquela diminuição proporcional de  $n$ -alcanos Tipo A em *calli* embriogénicos relativamente aos não-embriogénicos, provavelmente devido ao crescimento dos embriões somáticos (fig. VI.6), parece antever para os  $n$ -alcanos de cadeia curta (Tipo A), um papel como reservas translocáveis durante os primeiros passos da germinação dos embriões a partir de tecidos somáticos.

Algumas das funções dos  $n$ -alcanos nas plantas, podem ser previsíveis pelos diferentes estados físicos apresentados a temperaturas fisiológicas em função do comprimento da respectiva cadeia. Diagramas de fase de  $n$ -alcanos mostram que  $C_{16}$  e  $C_{17}$  possuem temperaturas de fusão perto dos 20 °C, enquanto que para  $C > 20$  aquelas temperaturas ultrapassam os 35 °C (27). Este facto, juntamente com o efeito par-ímpar nos pontos de fusão e características de cristalização dos  $n$ -alcanos de cadeia longa (27), poderão explicar quer a importância dos  $n$ -alcanos de cadeia longa ímpar na impermeabilização das superfícies dos tecidos em contacto com a atmosfera, quer a mobilidade intra e intercelular dos  $n$ -alcanos de cadeia curta nos tecidos internos.

Um outro facto interessante consistiu na alteração do perfil de  $n$ -alcanos observada na fase de crescimento exponencial dos *calli* ( $t_2$ ) para a fase estacionária ( $t_3$ ). A distribuição normal dos  $n$ -alcanos de cadeia curta observada em  $t_2$ , foi substituída em  $t_3$ , por uma distribuição achatada abrangendo uma gama mais ampla de compostos e com uma aparente preferência por  $n$ -alcanos de cadeia par (fig. VI.7), um perfil muito pouco

comum em plantas. Weete *et al.* (3) descreveram resultados algo semelhantes quando compararam os perfis de *n*-alcanos de *calli* habituados (mantêm-se sem capacidade morfogénica) com *calli* teratogénicos (que apresentaram diferenciação de caules e folhas) de culturas de *Nicotiana tabacum*. Tal como os CNE de linho na fase exponencial de crescimento ( $t_2$ ), os *calli* habituados de *N. tabacum* apresentaram uma distribuição tipo-gaussiana na gama C<sub>17</sub>-C<sub>28</sub> mas com uma ligeira predominância dos compostos de cadeia par. Um pouco à semelhança dos embriões somáticos, os tecidos teratogénicos de tabaco mostraram uma distribuição achatada na gama C<sub>22</sub>-C<sub>28</sub> com C<sub>29</sub> e C<sub>31</sub> como compostos maioritários. Esta diferença nos perfis de distribuição dos *n*-alcanos nos dois tipos de tecido, Tipo A vs. Tipo B, encontra-se relacionada com a síntese de *n*-alcanos extracelulares (de ceras epicuticulares), muito provavelmente nas células epidérmicas dos órgãos e embriões induzidos a partir dos *calli*. A existência dum padrão Tipo A, geralmente associado a culturas de *calli* heterotróficos ou fotomixotróficos, a tecidos jovens não diferenciados, e aos lípidos internos de tecidos diferenciados (1), não se encontra ainda bem esclarecida. Provavelmente diferenças no metabolismo lipídico e/ou a existência de um sistema enzimático diferente, responsável pela síntese de *n*-alcanos de cadeia curta (1) poderão explicar aquele padrão.

O mecanismo descrito para a síntese de *n*-alcanos de cadeia longa, onde a descarboxilação de ácidos gordos de cadeia par levam à formação de *n*-alcanos de cadeia ímpar, explicam satisfatoriamente o padrão Tipo B (22). A distribuição Tipo A, com *n*-alcanos de cadeia mais curta e sem predominância de compostos de cadeia ímpar, não pode, contudo, ser explicada por aquela via. Segundo alguns autores, os ácidos gordos ou seus derivados estão intimamente relacionados com o precursor directo dos *n*-alcanos produzidos nas plantas (1), sendo a  $\alpha$ -oxidação destes ácidos considerada como participando na síntese de *n*-alcanos de cadeia par (1, 28). Um estudo recente com mutantes de *Arabidopsis* deficientes na produção de ceras (29) revelou que a via descarboxilativa não pode usar como precursores ácidos gordos de cadeia curta e, portanto, apenas *n*-alcanos de cadeia longa podem ser sintetizados por aquela via. É possível que uma via intermediária de  $\alpha$ -oxidação produza os *n*-alcanos Tipo A. Nesse caso, e tal como foi admitido por Bognar *et al.* (28), é provável que haja uma contribuição da via  $\alpha$ -oxidativa mais significativa nos *calli* em crescimento activo, levando a uma proporção de *n*-alcanos de cadeia par mais elevada que aquela

geralmente encontrada nos tecidos epidérmicos de órgãos mais diferenciados, tais como os embriões somáticos.

O facto de se verificar maior quantidade de *n*-alcanos em tecidos ou células fotoautotróficas comparativamente aos tecidos ou células heterotróficas ou fotomixotróficas, e deste diferencial ser devido ao aumento específico de *n*-alcanos Tipo B, parece indicar que o metabolismo dos ácidos gordos, dependente da actividade cloroplastidial, estará na base da síntese destes *n*-alcanos mas não na dos do Tipo A.

### *Conclusões e perspectivas*

Os resultados obtidos com o sistema do linho vieram mostrar que este é um bom modelo experimental para o estudo de diversos problemas relacionados com o padrão de distribuição dos *n*-alcanos Tipo A. O esclarecimento de vias biossintéticas, dos sistemas enzimáticos envolvidos e mecanismos reguladores, o esclarecimento da sua função fisiológica e localização intracelular, incluindo a hipótese de funcionarem como reservas altamente reduzidas de elevado potencial energético em tecidos não fotoautotróficos e, finalmente, o seu eventual papel no crescimento celular e envolvimento na embriogénese somática são exemplos de estudos que poderão vir a ser efectuados com este modelo.

Tendo como suporte experimental um sistema reprodutível onde as diferentes fases de desenvolvimento – desdiferenciação dos tecidos somáticos, formação de *callus* (com e sem capacidade embriogénica) e produção indirecta de embriões somáticos – estão bem caracterizadas, a biologia molecular poderá dar um contributo fundamental na resposta a estas questões. Por exemplo, a obtenção de *callus* deficiente na produção total ou parcial de *n*-alcanos Tipo A permitiria estudar o envolvimento destes compostos na embriogénese e no desenvolvimento precoce dos embriões somáticos.

## Bibliografia

- 1 **Kaneda** T. (1969) Hydrocarbons in spinach: two distinctive carbon ranges of aliphatic hydrocarbons. *Phytochemistry* 8, 2039-2044.
- 2 **Walton** T.J., Waxes, cutin and suberin. *In*: J.L. Harwood and J.R Bowyer (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 4, Academic Press, 1990, pp. 105-158.
- 3 **Weete** J.D., Venketeswaran S. e Laseter J.L. (1971) Two populations of aliphatic hydrocarbons of teratoma and habituated tissue cultures of tobacco. *Phytochemistry* 10, 939-943.
- 4 **Osborne** R., Salatino M.L.F. e Salatino A. (1989) Alkanes of foliar epicuticular waxes of the genus *Encephalartos*. *Phytochemistry* 28, 3027-3030.
- 5 **Borges del Castillo** J., Brooks C.J.W., Cambie R.C., Eglinton G., Hamilton R.J. e Pellitt P. (1967) The taxonomic distributions of some hydrocarbons in gymnosperms. *Phytochemistry* 6, 391-398.
- 6 **Martin-Smith** M. e Subramanian G. (1967) Surface wax components of five species of *Cordateria* (Graminae) – a chemotaxonomic comparison. *Phytochemistry* 6, 559-572.
- 7 **Herbin** G.A. e Robins P.A. (1968) Studies on plant cuticular waxes – I. The chemotaxonomy of alkanes and alkenes of the genus *Aloe* (Liliaceae). *Phytochemistry* 7, 239-255.
- 8 **Osborne** R. e Stevens J.F. (1996) Epicuticular waxes and glaucousness of *Encephalartos* leaves. *Phytochemistry* 42, 1335-1339.
- 9 **Skorupa** L.A., Salatino M.L.F. e Salatino A. (1998) Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): taxonomic meaning. *Biochemical Systematics and Ecology* 26, 655-662.
- 10 **Esteban** J., Martínez-Castro I., Vargas P. e Sanz J. (1999) Chemosystematic study on leaf volatile compounds of *Saxifraga* L. series *Ceratophyllae* (Saxifragaceae). *Bioch. Syst. Ecol.* 27, 255-268.
- 11 **Kaneda** T. (1968) Biosynthesis of long-chain hydrocarbons. II. Studies on the biosynthetic pathway in tobacco. *Biochemistry* 7, 1194-1202.
- 12 **Eglinton** G. e Hamilton R.J., *In*: T. Swain (Ed.) *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, London and New York, 1963, pp. 187-217.

- 13 **Somerville** C., Browse J., Jaworski J. e Ohlrogge J., Lipids. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissen and R.L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000, pp. 507-512.
- 14 **Giese** B.N. (1975) Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry* 14, 921-929.
- 15 **Liu** W., Hildebrand D.F. e Collins G.B. (1995) Auxin-regulated changes of fatty acid content and composition in soybean zygotic embryo cotyledons. *Plant Sci.* 106, 31-42.
- 16 **Herbin** G.A. e Robins P.A. (1969) Patterns of variation and development in leaf wax alkanes. *Phytochemistry* 8, 1985-1998.
- 17 **Baker** E.A., Bukovac M.J. e Flore J.A. (1979) Ontogenic variations in the composition of peach leaf wax. *Phytochemistry* 18, 781-784.
- 18 **Salasoo** I. (1983) Effect of leaf age on epicuticular wax alkanes in *Rhododendron*. *Phytochemistry* 22, 461-463.
- 19 **Hietala** T., Hiekkala P., Rosenqvist H., Laakso S., Tahvanainen L. e Repo T. (1998) Fatty acid and alkane changes in willow during frost-hardening. *Phytochemistry* 47, 1501-1507.
- 20 **Rieley** G., Welker J.M., Callaghan T.V. e Eglinton G. (1995) Epicuticular waxes of two arctic species: compositional differences in relation to winter snow cover. *Phytochemistry* 38, 45-52.
- 21 **Talleux** L.R. e Grenier de March G. (1999) Lipid and fatty acid composition in non-embryogenic calli and embryogenic tissues in wild cherry (*Prunus avium*). *Physiol. Plantarum* 105, 513-520.
- 22 **Carriere** F., Chagvardieff P., Gil G., Pean M., Sigoillot J.C. e Tapie P. (1990) Paraffinic hydrocarbons in heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. *Plant Sci.* 71, 93-98.
- 23 **Joy** IV R.W., Yeung E.C., Kong L. e Thorpe T.A. (1991) Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27, 32-41.
- 24 **Sutter** E. e Langhans R.W. (1982) Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60, 2896-2902.
- 25 **Yadegari** R., Paiva G.R., Laux T., Koltunow A.M., Apuya N., Zimmerman J.L., Fischer R.L., Harada J. e Goldberg R.B. (1994) Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *The Plant Cell* 6, 1713-1729.
- 26 **Lamarque** A.L., Fortunato R.H. e Guzmán C.A. (1998) Seed oil alkanes from leguminosae species: even-carbon number preference. *Phytochemistry* 49, 731-736.
- 27 **Sirota** E.B. e Herhold A.B. (1999) Transient phase-induced nucleation. *Science* 283, 529-532.

- 28 **Bognar** A.L., Paliyath G., Rogers L. e Kolattukudy P.E. (1984) Biosynthesis of alkanes by particulate and solubilized enzyme preparations from pea leaves (*Pisum sativum*). Arch. Bioch. Biophys. 235, 8-17.
- 29 **Millar** A.A., Clemens S., Zachgo S., Giblin E.M., Taylor D.C. e Kunst L. (1999) *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. The Plant Cell 11, 825-838.



# VII

---

*Considerações finais e Perspectivas futuras*

Uma vez concluído o plano de trabalhos desta dissertação e retomando os objectivos gerais a que nos tínhamos proposto (Capítulo I), importa fazer o resumo dos principais resultados obtidos e perspectivar novas linhas de investigação com o conhecimento adquirido.

Relativamente à primeira parte do trabalho – **elaboração de protocolos de micropropagação do linho (*Linum usitatissimum* L.)** – o largo espectro de respostas às condições do meio de cultura permitiu a formulação de protocolos para obtenção de diferentes culturas *in vitro* de linho em meio MS, nomeadamente, culturas de *calli*, culturas rizogénicas, caulogénicas e embriogénicas, e a construção uma base racional para o estabelecimento de culturas embriogénicas a partir de segmentos hipocotiledonares, no que diz respeito à influência de factores do meio.

Relativamente à segunda parte do trabalho – **estudo da variação de compostos de natureza lipídica em associação com o crescimento e a morfogénese de culturas *in vitro* de linho** – foi observada uma elevada especificidade e variabilidade no tipo de cultura relativamente à composição de compostos de natureza lipídica, nomeadamente, ácidos gordos, alcanos e esteróis, bem como uma elevada variação ontogénica destes compostos associada ao processo de indução e desenvolvimento de embriões somáticos. Tais factos permitem pensar no modelo do linho como um sistema experimental adequado à realização de estudos sobre o metabolismo de compostos lipídicos e sobre as alterações da expressão génica associadas aos diferentes tipos de cultura e ao processo embriogénico. Este tipo de estudos abriria perspectivas para várias linhas de investigação.

A realização de estudos metabólicos em sistemas *in vitro* reprodutíveis como o do linho possibilitaria não só o conhecimento de processos biossintéticos ainda mal esclarecidos, tais como a biossíntese de alcanos e ácidos gordos de cadeia média (1), como ainda a influência de factores do meio no rendimento de compostos lipídicos de interesse. Abordagens metabolómicas nestes sistemas possibilitariam, eventualmente, chegar à regulação das vias metabólicas operantes em cada cultura e assim, à manipulação da produção de metabolitos de interesse, de natureza lipídica, quer nos diferentes tipos de cultura *in vitro* quer nas sementes desta espécie.

Culturas de *calli* não-morfogénicos, tecidos indiferenciados e dependentes do meio de cultura, poderão ser um óptimo recurso para a manipulação de vias metabólicas de interesse, sendo já utilizadas culturas de *calli* de outras espécies como fonte de metabolitos (2).

Por outro lado, o conhecimento dos mecanismos através dos quais as vias operantes ao longo do processo embriogénico são controladas ajudaria a perceber a importância e o papel dos diferentes lípidos durante o desenvolvimento ontogénico das plantas.

O aparecimento de fenótipos morfologicamente aberrantes em plântulas de linho obtidas por germinação de sementes em meios suplementados com fito-reguladores foi já relacionado com uma alteração no metabolismo dos esteróis. O facto de se terem observado fenótipos semelhantes em plântulas de linho obtidas por embriogénese somática e em mutantes espontâneos de *Arabidopsis* que foram associados a desequilíbrios nos gradientes polares de auxinas (3, 4), faz do sistema desenvolvido para o linho um modelo versátil para o estudo da inter-relação entre auxinas e esteróis no desenvolvimento de padrões ontogénicos aberrantes.

O linho é susceptível de ser transformado por *Agrobacterium* (5) e, embora este método de transformação de explantes de hipocótilo de linho diminua a sua capacidade morfológica, a diferenciação de *callus* com células transformadas a partir dos explantes é quase total (6). Um desafio seria a indução de embriogénese a partir deste material onde a transferência de genes para os explantes primários de hipocótilo permitiria estudar o efeito de determinados produtos génicos no processo da embriogénese somática.

Muito está por conhecer no que diz respeito às bases moleculares inerentes ao processo embriogénico (somático ou zigótico) de desenvolvimento vegetal. O mesmo se pode dizer quanto à biossíntese e ao controlo do metabolismo lipídico no contexto da indução, expressão e desenvolvimento de embriões somáticos.

A análise funcional de sequências de DNA clonadas, relacionadas com o metabolismo dos lípidos durante a embriogénese somática, poderia, não só, dar a conhecer o papel deste tipo de compostos neste processo, como também contribuir para a compreensão da base molecular do controlo da expressão génica e proporcionar assim, um melhor entendimento dos processos subjacentes ao programa de desenvolvimento vegetal (7).

Cerca de 90 % do óleo vegetal produzido é utilizado em nutrição humana (1), existindo actualmente um elevado interesse não só em novas aplicações dos compostos existentes,

nomeadamente PUFAs (8), como ainda, na produção de novos lípidos em plantas (1). A engenharia genética pode ser utilizada como ferramenta complementar às técnicas de melhoramento vegetal tradicionais, no sentido de aumentar o conteúdo em óleo e modificar a composição em ácidos gordos de culturas oleaginosas (9). De facto, novos lípidos de reserva, com ácidos gordos modificados, têm vindo a ser produzidos através do recurso àquela técnica (1). A combinação de técnicas de cultura *in vitro* com técnicas de biologia molecular poderá contribuir para a construção de novos sistemas de produção de metabolitos como de novos óleos de aplicação alimentar e não-alimentar. Globalmente, o conhecimento adquirido com o tipo de estudos mencionados irá contribuir decisivamente para perceber a síntese dos ácidos gordos e a regulação da síntese de outros constituintes de natureza lipídica, nomeadamente dos lípidos de reserva, permitindo o redireccionamento de uma tecnologia essencialmente empírica para uma tecnologia preditiva de “design” de lípidos (1).

- 1 **Töpfer R.**, Martini N. e Schell J. (1995) Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268, 681-686.
- 2 **Mcdonald K.A.**, Jackman A.P. , Thorup J.E. e Dandekar A.M. (1995) Plant callus as a source of biochemicals. *App. Bioch. Biotech.* 54, 93-108.
- 3 **Mayer U.**, Buttner G. e Jurgens G. (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 117, 149-162.
- 4 **Przemeck G.K.**, Mattsson J., Hardtke C.S., Sung Z.R. e Berleth T. (1996) Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200, 229-237.
- 5 **Dong J.Z.** e McHughen A. (1993) An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 88, 61-71.
- 6 **Jordan M.C.** e McHughen A. (1988) Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Rep.* 7, 285-287.
- 7 **Walden R.** e Schell J. (1991) Tissue culture and the use of transgenic plants to study plant development (Invited Review). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27, 1-10.
- 8 **Gill I.** e Valivety R. (1997) Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (Review). *Tibtech.* 15, 401-409.
- 9 **Weselake R.** (2000) Lipid biosynthesis in cultures of oilseed rape. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36, 338-348.

## *Apêndices*

---

## Apêndice A – Composição e preparação dos meios de cultura

### 1 - Composição do meio base de Murashige e Skoog (MS)

Composto	Concentração (mg/l)
<b>Nutrientes</b>	
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
<i>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	27,80
<i>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</i>	22,30
<i>KI</i>	0,83
<i>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</i>	0,025
<i>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	8,6
<i>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</i>	0,025
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	6,20
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</i>	0,25
<b>Vitaminas</b>	
Ácido nicotínico	0,50
Tiamina.HCl	0,10
Piridoxina.HCl	0,50
<i>mio</i> -Inositol	100,0
<b>Aminoácidos</b>	
Glicina	2,00

Nota: Todos os produtos utilizados eram marca comercial SIGMA ou MERCK.

### 2 - Preparação do meio MS

A partir de duas soluções stock 10x, uma composta pelos macronutrientes (identificados a negrito na formulação) e outra pelos micronutrientes (identificados a itálico), foi preparado por diluição com água desionizada aproximadamente 80 % do volume de solução necessário. Adicionou-se posteriormente os volumes adequados do sulfato de ferro que se encontrava em solução com o Na<sub>2</sub>EDTA nas proporções do meio MS, bem como os das soluções de vitaminas. Seguidamente adicionaram-se as quantidades de *mio*-inositol, sacarose e agar de modo a que na solução final ficassem nas concentrações

de 0,01 %, 2 % e 0,8 %, respectivamente. O pH foi ajustado para 5,7 com uma solução KOH 0,1 N, após o que o meio foi fervido para cozimento do agar e distribuído por tubos de cultura (10 ml/tubo). Os tubos foram rolhados com algodão cardado e autoclavados durante 20 min. a 1 atm. Sempre que o meio basal foi suplementado com reguladores de crescimento, estes eram adicionados antes de se ajustar o pH do meio sendo esterilizados conjuntamente com o meio de cultura. Soluções aquosas de 1 mg/ml de cada um dos reguladores de crescimento utilizados eram também previamente preparadas, e tal como as outras soluções, foram mantidas a 4 °C e renovadas sempre que necessário.

### *3 – Preparação e manutenção das culturas de tecidos in vitro*

Todas as manipulações do material vegetal foram feitas em câmara de fluxo laminar horizontal em condições de assépcia. A câmara com filtros Hepa era deixada a esterilizar por radiação UV durante a noite ou pelo menos durante 2 h.

Com o auxílio de material de dissecação esterilizado pelo calor seco (em estufa a 180 °C durante 4 h), o material vegetal a inocular ou repicar para meio fresco era manipulado nas proximidades duma chama de bico de Bunsen e colocado nos respectivos tubos de cultura. Um procedimento obrigatório consistia na passagem das bocas dos tubos de cultura à chama antes de se retirar o material a repicar ou antes de se voltar a rolar o tubo inoculado. Terminada a inoculação, as rolhas eram queimadas à chama e os tubos tapados com tampas de papel de estanho.

## *Apêndice B - Análise estatística*

### *1 – Análise de variâncias (ANOVA)*

A análise de variâncias é uma das ferramentas analíticas mais potentes em estatística (1) e portanto é aquela que é, tentativamente, mais utilizada na análise estatística de resultados. O recurso a este teste tem como objectivo principal comparar as médias obtidas para os diferentes grupos constituídos ou tratamentos considerados uma fonte potencial de variabilidade. A essência da ANOVA é fornecer um procedimento aritmético de modo a subdividir a variação total dos dados em dois conjuntos: a variação entre grupos (ou devido ao tratamento) e a variação dentro dos grupos (variação residual ou erro) (1). Tal como em todos os procedimentos estatísticos, a ANOVA tem um conjunto de pressupostos básicos que têm de ser cumpridos de modo a assegurar a validade do teste:

- a) Os dados têm de ser obtidos aleatoriamente ou por outro processo não enviesado (do inglês “unbiased”).
- b) A população donde os grupos de dados são retirados tem de ter uma distribuição normal (ou aproximadamente normal).
- c) As variâncias dentro de cada grupo não devem ser significativamente diferentes umas das outras, i.e., devem ser homogêneas. A homogeneidade de variâncias, ou homocedasticidade, é um pressuposto que pode ser confirmado pelo teste de Bartlett.
- d) Tem de haver replicação no desenho experimental, i.e., a ANOVA não é possível com uma observação por grupo.
- e) Os efeitos dos níveis dos factores estudados têm de ser aditivos ou lineares.

### *2 – Testes de comparações múltiplas*

Geralmente não é válido empregar vários testes *t* (comparação de duas médias) para examinar as diferenças entre todos os pares de médias possíveis obtidas num ensaio experimental. Existem, contudo, procedimentos estatísticos que podem ser utilizados –



os testes de comparações múltiplas. Estes testes por serem aplicados após se ter realizado uma análise de variância e de esta ter revelado efeitos significativos dos factores, denominam-se testes *post hoc* ou “à posteriori”. Existem vários testes deste género e todos permitem comparar médias sob o pressuposto de não se introduzirem hipóteses “à priori” para o estudo. O teste HSD Tukey é um dos testes mais comumente aceites e usados (2). O teste Duncan é também bastante utilizado sendo adequado para variáveis seriadas é, no entanto, menos conservativo que o anterior.

### *3 – Validade da ANOVA e transformações de variáveis*

Para um aplicação válida da ANOVA e procedimentos relacionados, tal como os testes de comparações múltiplas, os pressupostos referidos têm de ser garantidos. Apesar da ANOVA e o teste HSD Tukey serem bastante robustos e suportarem pequenos desvios aos requerimentos de normalidade, homocedasticidade e aditividade, desvios mais severos podem levar a conclusões erróneas (2). Neste caso os dados deverão ser “corrigidos” de modo a obter um novo conjunto de dados que não se desvie sensivelmente dos pressupostos. Esta correcção para a não-normalidade, heterocedasticidade e não-aditividade é geralmente possível através de transformações matemáticas das variáveis (2). As transformações logarítmica, arco-seno e raiz quadrada são as mais comuns. A transformação logarítmica é usada essencialmente para corrigir problemas de não-aditividade e quando os coeficientes de variação<sup>1</sup> são constantes; a “arco-seno” para problemas de não-normalidade; e a “raiz quadrada” é aplicada quando o grupo das variâncias é proporcional ao das médias. Este último caso ocorre geralmente em dados biológicos quando as amostras são retiradas duma população com uma distribuição de Poisson (caso de contagens ou eventos raros) (2).

### *4 – Variáveis não-contínuas, distribuições não-normais e aproximações*

A ANOVA aplica-se a variáveis contínuas de distribuição aproximadamente normal. Quando a variável em estudo é uma variável descontínua, como por exemplo as

---

<sup>1</sup> O coeficiente de variação (CV) ou de variabilidade é definido como  $CV = SD/X$  ou  $CV = SD/X \times 100 \%$ , onde SD e o X são o desvio padrão e o valor médio estimados, e é uma medida de dispersão ou de variabilidade relativa (2).

variáveis que são “proporções” ou “frequências”, em os dados consistem de razões entre números inteiros (como por exemplo, a variável “percentagem de indução de embriogénese somática”), as análises possíveis são diferentes. Os testes utilizados foram o  $\chi^2$  e o Loglinear quando se tratavam de tabelas de contingência bidimensionais ou multidimensionais respectivamente. Relativamente às tabelas bidimensionais, a análise de tabelas de 3 ou mais dimensões reveste-se de dificuldades acrescidas, não só no que diz respeito à própria abordagem dos dados e visualização da tabela, mas também na interpretação dos resultados de análise. Os modelos loglineares permitem abordar tabelas de contingência multidimensionais de um modo coerente e estruturado. Além de averiguar a existência, ou não, de independência entre as variáveis ou atributos que presidiram à construção da tabela de contingência, a análise loglinear torna possível quantificar os efeitos que as variáveis ou a sua combinação exercem sobre os resultados da observação. O método, que tem forte afinidade para com a ANOVA, consiste em ajustar aos dados, modelos que caracterizem, tão bem quanto possível, a estrutura subjacente (3) (ver 2 e 3 para maiores desenvolvimentos). A estatística utilizada foi o  $\chi^2$  de Pearson.

No caso de contagens (como por exemplo a variável “número de embriões somáticos por explante embriogénico”), que como vimos tem teoricamente uma distribuição Poisson, pode acontecer que para  $m$  (valor médio) grandes a distribuição se aproxime duma normal (1) e portanto se possa aplicar a ANOVA. Quando isso não aconteceu procedeu-se primeiramente a uma transformação “raíz quadrada” de modo a estabilizar as variâncias e só depois se procedeu à ANOVA.

### *5 – Análise de correlação e de regressão*

Sempre que se quis estudar o grau de associação de duas variáveis ou o grau de dependência de uma variável em relação outra utilizou-se, respectivamente, a análise de correlação e de regressão incluídas nos pacotes de software utilizados (Statistica@4.1 da StatSoft, Inc.; Excel 8,0 Microsoft; KaleidaGraph<sup>TM</sup> 3,5 Synergy Software).

## 6 – Níveis de significância ( $\alpha$ ) e valor de $P$

Relativamente aos testes e análises realizadas adoptou-se a convenção de se considerar um valor de  $P$  igual a 5 % como um valor significativo. Para distinguir os níveis de significância adoptou-se a designação mais universalmente utilizada de:

- a)  $P > 5 \%$  - resultado não significativo (ns) (não se rejeita a hipótese nula)
- b)  $1 < P \leq 5 \%$  - resultado significativo (\*)
- c)  $0,1 < P \leq 1 \%$  - resultado muito significativo (\*\*)
- d)  $P \leq 0,1 \%$  - resultado muito altamente significativo (\*\*\*)

Em b), c) e d) rejeita-se a hipótese nula ( $H_0$ ) que diz que os grupos provêm duma mesma população, no caso da comparação de médias, ou que o coeficiente de regressão (ou declive) não é diferente de zero, no caso da análise de regressão. No caso das tabelas de contingência, o  $P$  é o nível de significância usado para decidir se um determinado efeito ou interacção num modelo contribui significativamente para o ajuste desse modelo. Um efeito ou interacção será incluído se o melhoramento no ajuste for significativo também ao nível de  $P = 0,05$  (4). Neste caso poder-se-à dizer que a  $H_0$  será que o efeito não contribui para explicar as frequências observadas.

No entanto, e sabendo que não existe um salto quântico de 4,5 para 5,5 % e que não há nada de sagrado acerca do valor 5 % (1), sempre que se achar pertinente e aconselhável podem discutir-se valores de  $P$  superiores e na vizinhança de 5 %.

## 7 - Análise de componentes principais (PCA)

A análise multivariada, de que a análise de componentes principais (PCA) é um exemplo, constitui um conjunto de técnicas estatísticas geralmente utilizadas com o propósito de explorar conjuntos de dados complexos e/ou extensos. Estes dados são geralmente constituídos por muitas variáveis independentes e dependentes, podendo estas estar mais ou menos correlacionadas entre si. O objectivo principal deste tipo de análise é reduzir o número de variáveis em estudo e/ou detectar uma estrutura nas relações entre variáveis. Basicamente, a análise de factores (FA) e de componentes principais, formam subconjuntos de variáveis coerentes (correlacionadas) independentes uns dos outros e, a partir de combinações lineares das variáveis em cada subconjunto, geram-se factores ou variáveis sintéticas, representativos dos processos subjacentes às

correlações existentes. A representação em diagramas 2D das variáveis independentes, através de eixos definidos pelos factores criados, revelará um padrão de distribuição que permitirá recuperar uma eventual estrutura latente nos dados e, então, racionalizar sobre os fenómenos que lhes estarão subjacentes. No presente trabalho, utilizou-se a PCA, por ser a técnica mais adequada à natureza dos dados e pelo facto de não ser afectada pela multicolinearidade (elevada correlação) entre variáveis dependentes. Esta característica permite incluir na análise, variáveis correlacionadas pela via do metabolismo dos ácidos gordos mas pertinentes para interpretação do sistema em estudo. Não foi portanto pelo carácter exploratório que se procedeu a este tipo de abordagem, mas com o objectivo de tentar distinguir dum modo claro, relações entre os ácidos gordos e os fenómenos do crescimento de tecidos e da embriogénese somática. O manual do programa programa “ADE-4”, onde se encontram algumas bases teóricas e orientações práticas, encontra-se em formato electrónico pdf (5). Outras referências virtuais foram consultadas (4, 6).

- 1 **Warlaw** A.C. *Practical Statistics for experimental Biologists*. John Wiley & Sons, Chichester, 1985, pp. 290.
- 2 **Zar** J.H. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall International Edition (2<sup>nd</sup> Ed.), New Jersey, 1984, pp. 718.
- 3 **Murteira** B.J. *Probabilidades e Estatística* (2<sup>a</sup> edição), Vol. II, McGraw-Hill, Lisboa, 1990, pp. 417-441.
- 4 *Statistica*. Electronic Statistical Textbook, StatSoft, Inc. 1984-89  
<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>
- 5 **Thioulouse** J., Chessel D., Dolédec S., e Olivier J.M. (1997) “ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software”. *Statistics and Computing* 7, 75-83.
- 6 **Wulder** M. (2000/03/12) *Multivariate Statistics: A Practical Guide*.  
<http://www.pfc.cfc.gc.ca/landscape/inventory/wulder/mvstats/index.html>

## Apêndice C – Matrizes de correlação das análises de componentes principais (PCA)

### 1 – PCA aplicada ao estudo da variação ontogénica dos ácidos gordos livres (AGL)

Tabela V.9 – Hemi-matriz de correlação obtida na PCA realizada a partir dos dados da Tabela V.7 – valor médio obtido para os diferentes AGL. Matriz de dupla entrada onde no cruzamento de duas variáveis dependentes se encontram os respectivos coeficientes de correlação (r).

14:0	1,00													
15:0	0,37	1,00												
<b>16:0</b>	-0,15	-0,24	1,00											
16:1	0,30	-0,47	0,56	1,00										
17:0	0,37	0,06	-0,13	-0,10	1,00									
18:1	-0,51	-0,03	0,32	-0,42	-0,31	1,00								
<b>18:2</b>	-0,57	-0,25	<b>0,88</b>	0,20	-0,23	0,60	1,00							
<b>18:3</b>	-0,16	-0,49	<b>0,93</b>	0,74	-0,03	0,07	0,77	1,00						
20:0	-0,36	-0,33	-0,40	-0,23	0,37	-0,19	-0,15	-0,17	1,00					
20:1	0,47	0,40	-0,63	-0,58	0,55	-0,04	-0,66	-0,71	-0,04	1,00				
22:0	-0,06	0,41	0,59	-0,06	-0,15	0,43	0,55	0,31	-0,76	-0,05	1,00			
23:0	-0,41	0,41	0,31	-0,51	-0,24	0,56	0,53	0,04	-0,21	-0,09	0,62	1,00		
<b>24:0</b>	0,30	0,04	<b>-0,81</b>	-0,41	0,04	-0,15	<b>-0,82</b>	-0,78	0,03	0,73	-0,41	-0,27	1,00	

Considera-se que há multicolinearidade entre variáveis quando o coeficiente de correlação é superior a 0,8. Na matriz, os ácidos correlacionados e os respectivos coeficientes encontram-se assinalados a negrito.

Tabela V.10 – Hemi-matriz de correlação obtida na PCA obtida a partir de alguns dados referentes à Tabela V.8. As variáveis numeradas de 1 a 11 correspondem respectivamente a : **(1)** AGL insaturados **(I)**; **(2)** somatório dos AGL 16:0 e 18:1 **(16:0+18:1)**; **(3)** AGL insaturados/AGL totais **(I/T)**; **(4)** somatório dos AGL de cadeia muito longa/AGL totais **(VLCFA/T)**; **(5)** ácido palmítico/AGL totais **(16:0/T)**; **(6)** ácido esteárico/AGL totais **(18:0/T)**; **(7)** ácido oléico/AGL totais **(18:1/T)**; **(8)** ácido linoleico/AGL totais **(18:2/T)**; **(9)** ácido linolénico/AGL totais **(18:3/T)**; **(10)** 18:0/18:3; e **(11)** 18:3/18:2.

1	1,00										
2	<b>0,96</b>	1,00									
3	<b>0,88</b>	0,79	1,00								
4	<b>-0,99</b>	<b>-0,95</b>	<b>-0,87</b>	1,00							
5	-0,62	-0,45	<b>-0,89</b>	0,63	1,00						
6	<b>-0,87</b>	-0,79	<b>-0,99</b>	<b>0,84</b>	<b>0,84</b>	1,00					
7	-0,62	-0,54	-0,49	0,64	0,31	0,48	1,00				
8	0,76	0,69	<b>0,91</b>	-0,77	<b>-0,83</b>	<b>-0,90</b>	-0,21	1,00			
9	0,79	0,71	0,79	-0,78	-0,65	-0,78	<b>-0,82</b>	0,48	1,00		
10	-0,79	-0,73	<b>-0,97</b>	0,78	<b>0,86</b>	<b>0,98</b>	0,47	<b>-0,86</b>	-0,79	1,00	
11	0,11	0,09	-0,07	-0,08	0,15	0,08	-0,61	-0,47	0,54	0,04	1,00

## 2 – PCA aplicada ao estudo da variação ontogénica dos ácidos gordos esterificados (AGE)

Tabela V.13 – Hemi-matriz de correlação obtida na PCA realizada a partir dos dados da Tabela V.11 – valor médio obtido para os diferentes AGE. Matriz de dupla entrada onde no cruzamento de duas variáveis dependentes se encontram os respectivos coeficientes de correlação (r).

<b>12:0</b>	1,00									
14:0	0,20	1,00								
<b>16:0</b>	-0,29	-0,30	1,00							
18:0	0,41	-0,54	0,61	1,00						
<b>18:1</b>	0,06	~0	<b>0,83</b>	0,53	1,00					
<b>18:2</b>	-0,37	-0,39	<b>0,98</b>	0,57	0,80	1,00				
<b>18:3</b>	-0,61	-0,42	<b>0,88</b>	0,33	0,59	0,93	1,00			
20:0	-0,18	-0,33	0,06	0,28	-0,38	0,07	0,09	1,00		
<b>20:1</b>	<b>0,90</b>	-0,09	0,11	0,75	0,33	0,03	-0,26	-0,05	1,00	
<b>24:0</b>	-0,44	-0,28	<b>0,85</b>	0,29	0,78	<b>0,88</b>	<b>0,87</b>	-0,29	-0,10	1,00

A designação “~0” na tabela significa que  $|r| < 0,005$ .

Tabela V.14 – Hemi-matriz de correlação obtida na PCA obtida a partir de alguns dados referentes à Tabela V.12. As variáveis numeradas de 1 a 10 correspondem respectivamente a: (1) AGE insaturados (**I**); (2) AGE saturados (**S**); (3) somatório dos AGE de cadeia muito longa (**VLCFA**); (4) somatório dos AGE de cadeia muito longa saturados (**VLCFA S**); (5) AGE insaturados/AGE totais (**I/T**); (6) ácido esteárico/AGE totais (**18:0/T**); (7) ácido oléico/AGE totais (**18:1/T**); (8) ácido linoléico/AGE totais (**18:2/T**); (9) ácido linolénico/AGE totais (**18:3/T**); e (10) **18:3/18:2**.

<b>1</b>	1,00									
<b>2</b>	0,75	1,00								
<b>3</b>	0,72	0,77	1,00							
<b>4</b>	<b>0,85</b>	0,56	<b>0,84</b>	1,00						
<b>5</b>	0,68	0,07	0,31	0,69	1,00					
<b>6</b>	-0,70	-0,21	-0,35	-0,78	<b>-0,80</b>	1,00				
<b>7</b>	0,28	0,52	0,05	0,04	-0,24	-0,24	1,00			
<b>8</b>	<b>0,83</b>	0,36	0,52	<b>0,80</b>	<b>0,93</b>	<b>-0,82</b>	-0,02	1,00		
<b>9</b>	0,53	-0,14	0,14	0,59	<b>0,97</b>	-0,78	-0,33	<b>0,83</b>	1,00	
<b>10</b>	-0,08	-0,68	-0,39	0,05	0,57	-0,34	-0,60	-0,24	0,74	1,00